

## 7. Inhibidores de la neuraminidasa y nuevas estrategias terapéuticas frente al virus de la gripe (\*)

JOSÉ A. CABEZAS FERNÁNDEZ DEL CAMPO

*Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia.  
Catedrático Emérito de la Universidad de Salamanca*

### 1. INTRODUCCIÓN

*«No virus has been better studied, but few diseases (as influenza) are less understood. The influenza virus glycoproteins have become models for biologists interested in membrane assembly and function; knowledge of their tertiary (and even quaternary) structure surpasses that available for most other proteins».*

E. D. KILBOURNE, *Influenza*. Plenum Med. Co., New York (1987).

Aun cuando se han producido importantes avances en el conocimiento del virus de la influenza o gripe —singularmente en relación con el subtipo vírico que causó la famosa pandemia de los años 1918-19— desde que escribió el especialista Doctor Kilbourne (en 1987) la frase que encabeza esta página, hay que lamentar que el contenido de dicha sentencia sigue siendo válido en nuestros días, a pesar del extraordinario esfuerzo de investigación últimamente desarrollado. Pero este resultado, sólo parcialmente satisfactorio, debe constituir un aliciente adicional para proseguir la investigación sobre un tema de tanto interés científico, sanitario y económico.

---

(\*) Trabajo dedicado al Profesor Claude HANNOUN en homenaje a su fructífera labor relativa al estudio del virus de la gripe, desarrollada en el Instituto Pasteur de París, y como testimonio de la grata colaboración mantenida con él y su equipo investigador durante una veintena de años.

Con cierta imaginación, podría quizá plantearse esta investigación como un reto, duelo o desafío entre la «astucia» del virus para pervivir—superando sus propias limitaciones reproductivas a expensas de organismos más evolucionados— y las defensas que se le oponen por las células hospedadoras (mediante naturales mecanismos inmunitarios o por agentes artificiales, que son los medicamentos antigripales).

Para poder ganar la batalla al virus, será indispensable conocerle a fondo, en cada momento (pues es cambiante y movedizo), y cuáles son sus ardides o tretas en la lucha. Es decir, será necesario conocer su composición, su estructura y las peculiaridades de su ciclo biológico.

Con estos datos el hombre tratará de vencerle; aunque tal vez resulte imposible eliminarle definitivamente.

Cualquiera de las etapas del ciclo de la reproducción del virus que pueda ser satisfactoriamente bloqueada, interrumpiendo aquél, será un éxito para los humanos y para numerosas especies de animales que soportamos sus suaves o brutales zarpazos, manifestados como gripes benignas o graves, respectivamente, enfermedades causantes de frecuentes y llevaderas epidemias/epizootias o de terribles pandemias.

Seguidamente se resumen algunos datos relativos a dicho virus, como información previa acerca de algunas de las «armas» con que contamos los humanos en esta peculiar batalla: escasos agentes antrigripales de uso acreditado, y otros, prometedores, pero en diversas fases de ensayo todavía.

## **1.1. Antecedentes históricos sobre la gripe o influenza y sus virus:** **Resumen**

En 1742, Sauvage utilizó el término *grippe*, que guarda relación con la voz del antiguo francés *grippan* y con la alemana *greifen*, que significan «retener fuertemente, agarrar». La palabra *influenza*, actualmente equivalente para muchos (con ciertas limitaciones) a *gripe* (aunque no en otras épocas), es de uso más antiguo, ya que se utilizaba en la Edad Media, por haberse atribuido a la «influencia» de los astros (o del frío, con más fundamento) la aparición de dicha enfermedad. Una descripción detallada de la misma fue realizada por Villani en Florencia en

1358. Diversos datos sobre antecedentes históricos de la gripe y sus virus se recogen en la Tabla I.

También poseemos cierta información acerca de epidemias de gripe aparecidas a lo largo del siglo XVIII. Y se tienen ya datos más precisos, aunque indirectos, de las pandemias o grandes epidemias de los años 1889-90 y 1898-1900. Esta información es indirecta en el sentido de que corresponde a la detección de anticuerpos, lograda últimamente en personas nacidas poco antes de aquellos años. Sin embargo, la verdadera información directa de la gripe y sus virus no se ha obtenido hasta comienzos de la década de 1930, en que se aisló y caracterizó el virus de procedencia porcina (1931) y el de procedencia humana (1933) (Tabla I).

Pero es sabido que fue la gripe de 1918-19 —impropiamente llamada «española»— la que dejó un recuerdo imborrable, que todavía perdura en nuestros días por haber causado la muerte de aproximadamente 50 millones de personas.

Podemos preguntarnos:

1. ¿Habían sido las grandes epidemias/pandemias de gripe anteriores a 1918 más mortíferas que ésta?
2. ¿Por qué ocasionó tantas muertes?

En relación con la primera cuestión, se puede considerar que, aun siendo muy peligrosas algunas pandemias anteriores, probablemente no revistieron el grado de mortalidad de ésta; y se proponen ya fundadas conjeturas sobre la posibilidad de aparición en 1918 de cambios que afectarían muy profundamente la biología molecular de los virus de la gripe.

Respecto a la segunda pregunta, es lógico pensar que las condiciones de hambre, depauperación, etc., coincidentes con los finales de la Primera Guerra Mundial —que ocasionó 8 millones de muertos— sufridas por la población de numerosos países (aunque no de todos) pudieron contribuir a este efecto, al que se añadió la utilización de unas medidas sanitarias poco eficaces (por inexistencia de vacunas y fármacos adecuados) (Cabezas, 1990).

A favor de esta interpretación está el hecho de la mortalidad enormemente más baja de la pandemia de 1957 (llamada «gripe asiática») y

de la pandemia de 1968 (la denominada «gripe de Hong Kong»). Una situación de la alimentación que puede considerarse como «normal» en muchas zonas de la Tierra, y la utilización de medidas sanitarias adecuadas, que se intensificaron a partir de los años cincuenta, podrían ser circunstancias que explicaran este efecto negativo menor causado por tales pandemias.

Pero cabe preguntarse: ¿Es todavía peligrosa la gripe en 2006? Ciertamente sí, afectando de modo especial a ancianos y niños, según es sabido. Incluso sin dañar seriamente la salud, los perjuicios económicos que continúa ocasionando la gripe común son de enorme cuantía.

TABLA I. *Algunos antecedentes históricos sobre la gripe y sus virus*

Año	Año
412 (a. C.) Hipócrates	1918 Dujarric de la Rivière (descubrimiento) Nicolle y Levailly (transmisión)
	1931 Shope (aislamiento del cerdo)
1358 Villani	1933 Smith, Andrewes y Laidlaw
	1934 (aislamiento y caracterización a partir de humanos) (tipo A)
	1936 Burnet (cultivo en huevo fecundado)
1729 Jussieu	1940 Francis y Magill, independientemente (hallazgo del tipo B)
1742 Sauvage (grippe)	1941 Hirst (hemaglutinación y elución a 37°)
1758	1944 (vacunas)
1782	1947 (oficina en Londres para epidemiología) Taylor (descubrimiento del tipo C)
1889	1957 («gripe asiática»; virus afines a los de 1889)
1898	1968 («gripe de Hong Kong»; virus afines a los de 1898)
	1981 Wiley, Skehel y Wilson (estructura tridimensional de la hemaglutinina)
	1983 Colman, Varghese y Laver (estructura tridimensional de la neuraminidasa)
	1988 Herrler <i>et al.</i> (descubrimiento de la glicoproteína HEF en el virus tipo C)

## 2. NEURAMINIDASA = SIALIDASA

La descripción de la morfología, composición, clasificación, características y epidemiología de los virus de la gripe se halla en las obras

de la especialidad. Otros datos aparecen en monografías, artículos de revisión y revistas de Virología, Biología Molecular, Microbiología, Bioquímica, etc.

Conviene ahora recordar únicamente que la nucleocápsida (integrada por las nucleoproteínas NP y el ARN, al que éstas rodean en forma helicoidal) y la proteína M son antígenos internos en los que se basa la clasificación de los virus de la gripe, según los tres tipos (A, B y C); y que los antígenos de superficie hemaglutinina (HA o H) y neuraminidasa (NA o N) o sialidasa (Cabezas y Hannoun, 1990) los que definen los subtipos (que se conocen solamente en el tipo A), hasta distinguirse actualmente en total nueve subtipos para la neuraminidasa y 16 para la hemaglutinina, aunque en la especie humana quedan reducidos a sólo algunos de ellos (véase más adelante).

### **2.1. Neuraminidasa = sialidasa de los virus tipos A y B de mamíferos y aves**

Lo que se indica a continuación se refiere fundamentalmente a la enzima neuraminidasa o sialidasa (EC 3.2.1.18) existente en los tipos A y B del virus de la gripe y a otra enzima, existente sólo en el tipo C, denominada sialato- *O*-acetilesterasa (EC 3.1.1.53), que ha sido más tarde caracterizada (véanse algunos datos en la Tabla II).

Según hizo notar Gottschalk (Cabezas, 1990) en 1972, la neuraminidasa presenta la particularidad de haber sido la primera enzima descubierta en un virus. Dicha enzima abrió un nuevo enfoque incluso en la caracterización de éstos, ya que «hasta 1940 era opinión generalizada que los virus estaban desprovistos de enzimas y que esta carencia de equipo enzimático era la diferencia fundamental entre virus y bacterias».

Realmente, el interés por el estudio de la neuraminidasa arranca de los trabajos de Hirst, de 1942, sobre aglutinación de los hematíes por virus de la gripe o influenza. Entre 1942 y 1947, diversos estudios señalaron la existencia en virus de la gripe y en algunas bacterias (como la causante del cólera) de un factor al que se denominó RDE (*receptor destroying enzyme*, enzima destructora de receptores) que sería responsable de que los hematíes tratados con filtrados de *Vidrio cholerae* o de *Clostridium perfringens* se hacían no aglutinables por virus de la gripe.

Gottschalk, en Australia, e independientemente de él, Klenk en colaboración con Faillard, en Alemania, averiguaron a comienzos de la década de los cincuenta que el ácido siálico era la sustancia receptora (existente en glicoconjugados situados en la parte externa de la membrana celular) que se liberaba por acción de esta enzima. (Datos sobre glicoconjugados pueden hallarse en algunas publicaciones como las de las referencias Cabezas, 1993; Cabezas, 1995a; Cabezas, 1995b; Cabezas, 2000.)

TABLA II. *Neuraminidasa (NA) = sialidasa*

---

*Composición y estructura*

Es una glicoproteína

Hay similitud estructural entre los tipos de NA conocidos

Los grandes cambios antigénicos resultan de «reagrupamientos» (*reassortments*) génicos o de mutaciones génicas peculiares

La homología (principalmente en las cabezas) entre N1 y N2 es del 40%

Es un tetrámero (formado por subunidades de M<sub>r</sub>60.000). La NA del virus A consta de 469 aminoácidos

También han sido cristalizadas dos NA de virus B

*Actividad*

Radica en la cavidad o «cráter»

Los cuatro centros activos están a 40 Å

La unión con el ácido siálico se cree no altera la estructura cuaternaria

Se han producido alteraciones cerca del sitio activo en los cambios antigénicos grandes del periodo posterior a 1957

Sólo el tetrámero (y no los monómeros) es la forma activa

Es una exoenzima (EC 3.2.1.18) que cataliza la hidrólisis de enlaces sialil – ( $\alpha$ , 2  $\rightarrow$  3), ( $\alpha$ , 2  $\rightarrow$  6) y ( $\alpha$ , 2  $\rightarrow$  8), aunque con distinta eficacia

*Función*

Principalmente, la liberación de los viriones recién formados, de la superficie externa de la célula hospedadora, evitando la agregación y acumulación de los mismos.

---

Si en la primera Nomenclatura y clasificación oficial de enzimas, del año 1961 (International Union of Biochemistry, 1961), solamente se decía de la *neuraminidase* (= neuraminidasa) (EC 3.2.1.18) que «probablemente hidroliza uniones á-2,6 entre el ácido *N*-acetilneuramínico y residuos de 2-acetilgalactosamina en varios mucopolisacáridos», esto mismo se repetía en las ediciones de 1964 (International Union of Bio-

chemistry, 1964) y 1965 (International Union of Biochemistry, 1965). En la de 1972 se la denomina, además, *sialidase* (= sialidasa), y se incluyen por primera vez tres referencias (que son de publicaciones de los años 1957-60 de su inicial descubridor, A. Gottschalk) (International Union of Biochemistry, 1972), las cuales apoyan su identidad y definen sus características.

La edición de la Nomenclatura de Enzimas del año 1984 señala como «nombre recomendado» el de *sialidase* y como «otro nombre» el de *neuraminidase*, alterando el orden anterior, y advierte que esta enzima «no actúa sobre los ácidos siálicos *O*-acetilados en [la posición] 4», e incluye seis referencias (una de ellas correspondiente a una publicación de nuestro laboratorio) (Cabezas *et al.*, 1980). Finalmente, en la edición de 1992, para la EC 3.2.1.18 se asigna el nombre de *exo- $\alpha$ -sialidase*, aunque se mantienen los de *neuraminidase* y *sialidase*, con seis referencias (entre ellas la de Cabezas *et al.*, 1980), pero ya se incluye por primera vez, además, una *endo- $\alpha$ -sialidase* (= endo- $\alpha$ -sialidasa) (EC 3.2.1.129) (Cabezas, 1991).

Asimismo, otra sialidasa, aunque probablemente con escasa o nula relación con los virus de la gripe, también ha sido incorporada a la nomenclatura oficial de enzimas: Es la *anhydrosialidase* (=anhidro-sialidasa) (EC 3.2.1.138) (Cabezas, 1991). Por último, en tripanosomas tiene particular importancia la *trans-sialidase* (trans-sialidasa) (Cabezas *et al.*, 1993).

Por otro lado, se ha planteado a veces la cuestión de si la sialidasa o neuraminidasa EC 3.2.1.18 debe ser considerada como una enzima o como varias enzimas, ya que se han hallado diferencias de tamaño molecular y cinéticas entre dichas enzimas procedentes de virus, de bacterias y de mamíferos. Además, en algunos materiales de esta última procedencia las actividades sialidásica,  $\beta$ -galactosidásica y carboxipeptidásica se presentan como un complejo multienzimático (véase en la publicación de la referencia Cabezas *et al.*, 1993).

La dualidad en el empleo de los nombres neuraminidasa y sialidasa (EC 3.2.1.18) es un reflejo de la controversia que existió inicialmente en la denominación de los ácidos hoy llamados siálicos, derivados del ácido neuramínico. E. Klenk (en Colonia, Alemania), a partir de cerebros de ciertos pacientes fallecidos, identificó un nuevo compuesto, hacia 1935,

al que denominó *Neuramin Säure* (= ácido neuramínico), asignándole una estructura que resultó ser inexacta. Independientemente, G. Blix y colaboradores (en Uppsala, Suecia), hacia 1936, aislaron, a partir de la mucina submaxilar bovina, una sustancia (de estructura que resultó también ser errónea, por ser un diholósido), al que denominaron *sialic acid*, por hallarse en la saliva (*sialon*, en griego). Hacia 1949, A. Gottschalk, en Canberra (Australia), sometió ciertas glicoproteínas a un tratamiento con virus de la gripe, obteniendo un producto —por acción de la enzima que se llamaba RDE (= sialidasa)— que poseía propiedades similares a las de la sustancia obtenida por Blix (y relacionado con el de Klenk). Establecida correctamente la estructura del ácido *N*-acetilneuramínico, principalmente por E. Klenk y H. Faillard, hacia 1954, se llegó a la conclusión de que existía un nuevo compuesto de cuya estructura fundamental derivaban otros varios, existentes en numerosos materiales biológicos a concentración relativamente elevada. Con objeto de disipar dudas y unificar criterios, Blix, Gottschalk y Klenk, en 1957 (Blix *et al.*, 1957), acordaron denominar a esa estructura fundamental *neuraminic acid* (= ácido neuramínico); y a los derivados, acetilados, glicolilados, etc. (frecuentemente acilados), ácidos siálicos. Hasta 1998, se consideraba que la «forma no sustituida, el ácido neuramínico, no existe en la Naturaleza» (Traving y Schauer, 1998).

Ahora, se admite que, en caso de hallarse, lo es en ínfima proporción respecto a los ¡50! aproximadamente ácidos siálicos identificados (hasta el año 2004) (Schauer, 2004); los cuales contienen restos: *N*-acetilo, *N*-glicolilo, 4-*O*-acetilo, 7-*O*-acetilo, 8-*O*-acetilo, 9-*O*-acetilo, 5-hidroxilo, 8-*O*-metilo, 9-*O*-lactilo, di-*O*-acetilo (en diversas posiciones), un tri-*O*-lactilo, 9-*O*-fosfato, o varios de algunos de estos residuos simultáneamente, etc. (más datos en torno a este complejo asunto pueden hallarse en las referencias siguientes: Gottschalk, 1960; Cabezas, 1961; Cabezas, 1968; Rosenberg y Schengrund, 1976; Schauer, 1982; Faillard, 1989; Reglero, 2004).

De esa confusión inicial en la terminología de los ácidos derivados del neuramínico, luego llamados siálicos, puede considerarse que arranca la dualidad en el empleo de los términos neuraminidasa y sialidasa, con uso preferente del primero (al que se ha pretendido imponer como único en el campo de la Virología, cuestión ésta no aceptada por algunos enzimólogos), de manera injustificada.



## 2.2. Métodos de valoración de la actividad neuraminidásica (= sialidásica)

De lo antes expuesto, se deduce que la caracterización y «tipificación» de las cepas o estirpes de los virus de la gripe requieren ineludiblemente la determinación de su actividad sialidásica, además de la de otras propiedades. Las técnicas de valoración de la sialidasa en diversos materiales (bacterias, protozoos, mamíferos) pueden aplicarse, con algunas adaptaciones, a los virus de la gripe y a paramixovirus (como el causante de la enfermedad de Newcastle, etc.).

Un problema que se plantea es el de si es indispensable separar y purificar la enzima a partir del virus o si se podría medir la actividad enzimática en el virus directamente. Ambas posibilidades pueden utilizarse actualmente, con tal de no inactivar o no hacerle perder gran parte de su actividad en lo procesos de separación (Cabezas *et al.*, 1982a; Cabezas *et al.*, 1981), en el primer caso, y de hallar técnicas suficientemente seguras (específicas y sensibles) si se usan los virus enteros.

Sustratos *naturales* tales como la *N*-acetilneuraminil-lactosa, la fetuina, el orosomucoide, glicoproteínas de glándulas submandibulares y la glicoforina (Cabezas *et al.*, 1980; Cabezas *et al.*, 1981; Cabezas *et al.*, 1982b; Cabezas *et al.*, 1983a), pueden emplearse con este objeto. Otro grupo de sustratos lo constituyen los *artificiales*, entre los que se han usado el *p*-nitrofenil-*N*-acetilneuramínico y, últimamente más, el metilumbeliferil-*N*-acetilneuramínico (Cabezas *et al.*, 1980). Un tercer grupo de sustratos es el formado por derivados marcados con elementos *radioisotópicos*, frecuentemente con tritio, si bien su uso no es habitual. Valorando la concentración del ácido siálico liberado por acción de la sialidasa o el resto de la molécula (éste directa o indirectamente), se consigue medir la actividad enzimática existente. En el caso de la *N*-acetilneuraminil-lactosa, que es un sustrato natural muy utilizado, la medida de la actividad suele hacerse por la vía indirecta —para evitar interferencias que pueden presentarse en reacciones sensibles pero no específicas de ácidos siálicos— tal como muestra la figura 1 (Cabezas *et al.*, 1980; Cabezas *et al.*, 1983a). En las condiciones operatorias adecuadas, se consigue que la concentración del NADH formado sea proporcional a la concentración de los productos resultantes de la hidrólisis del sustrato por la acción enzimática:

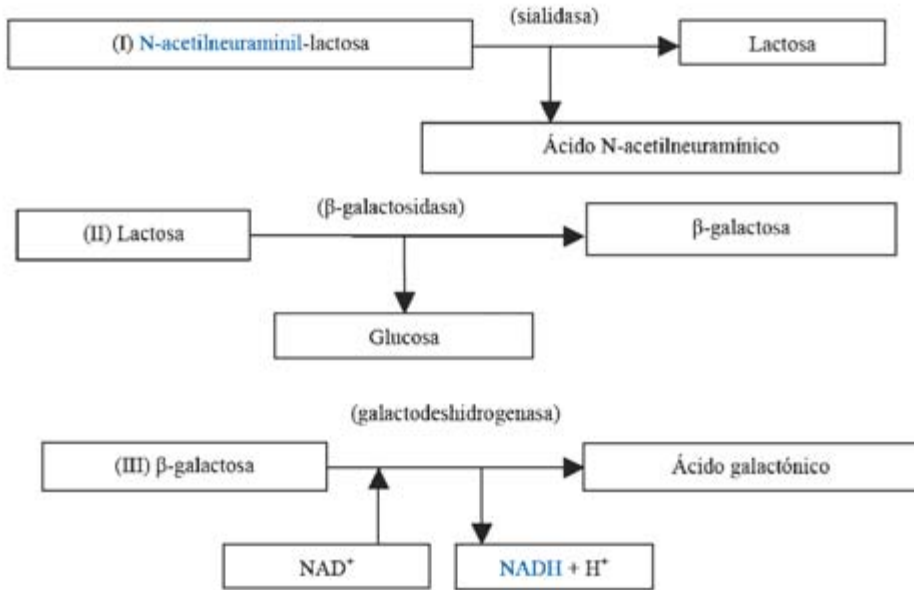


FIGURA 1. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD SIALIDÁSICA usando como sustrato N-acetilneuraminil-lactosa (Cabezas *et al.*, 1983b; Cabezas *et al.*, 1984).

La determinación del NADH puede hacerse por espectrofotometría a 334 nm, procedimiento válido, pero que en la práctica adolece del defecto de su escasa sensibilidad (Cabezas *et al.*, 1983a).

Este inconveniente puede ser obviado haciendo la valoración de la concentración del NADH por espectrofluorimetría, con lo que se aumenta la sensibilidad diez veces, llegando entonces a ser ésta similar a la de otros procedimientos, como los basados en la reacción del ácido tiobarbitúrico (Cabezas *et al.*, 1983a). La determinación por espectrofluorimetría fue puesta a punto por nuestro laboratorio ya en 1983 (Cabezas *et al.*, 1983b).

Un año más tarde publicamos un método que desarrollamos utilizando las técnicas luminiscentes (Cabezas *et al.*, 1984). Concretamente, con él la sensibilidad se puede incrementar todavía mil veces más, acudiendo a la medida del NADH por bioluminiscencia; aunque se necesitan aparatos especiales y reactivos de altísima pureza (química y microbiológica), dadas las características de las técnicas luminiscentes. Ahora

bien, la sensibilidad que se puede lograr así es similar a la de las técnicas radioisotópicas, sin los inconvenientes de éstas, pudiéndose determinar cantidades tan ínfimas como 5 pmol de ácido siálico liberado (equivalentes a 1,5 ng).

Así puede medirse «la actividad sialidásica directamente en el virus intacto, evitando los inconvenientes de la extracción de la enzima» (Cabezas *et al.*, 1984); lo que constituye una ventaja muy considerable en la detección directamente de este virus en muestras biológicas. Recientemente, un procedimiento apoyado en esta modalidad de detección del virus parece ser que está siendo estudiado (véase sección 5).

Asimismo, para otros fines, otras técnicas analíticas, pero de menos sensibilidad, pueden ser aplicadas (Cabezas *et al.*, 1980; Cabezas *et al.*, 1981; Cabezas *et al.*, 1982b; Cabezas *et al.*, 1983a).

### 2.3. Variación de tipos A y B y de subtipos A de virus de la gripe y actividad sialidásica

Es sabido que, en un momento dado, suelen circular en la población humana varios tipos (A, B) y subtipos A; por lo que conviene utilizar vacunas en relación con los mismos para poderlos combatir. También se conoce el hecho de la reaparición de algún subtipo que había circulado con anterioridad (el A/H1N1).

Los cambios denominados *deslizamiento antigénico* o *deriva* (*glissement* en francés, *drift* en inglés) serían las respuestas de los virus, que «intentarían» mantenerse así mediante mutaciones «puntuales». Pero, agotadas estas posibilidades, cada 10-20 años aproximadamente se producen en ellos cambios más bruscos, los conocidos como *saltos antigénicos* (*cassure* o *shift*, en francés y en inglés, respectivamente):

Se admite que la reaparición de antiguos subtipos podría ser coincidente con la desaparición, por fallecimiento después de los 70-80 años, de muchas personas que estaban inmunizadas frente a aquéllos. Y también se podría encontrar de este modo una explicación a las similitudes encontradas entre los virus de 1889-90 y los de 1957, por un lado, y entre los de 1898-1900 y los de 1968, por otro.

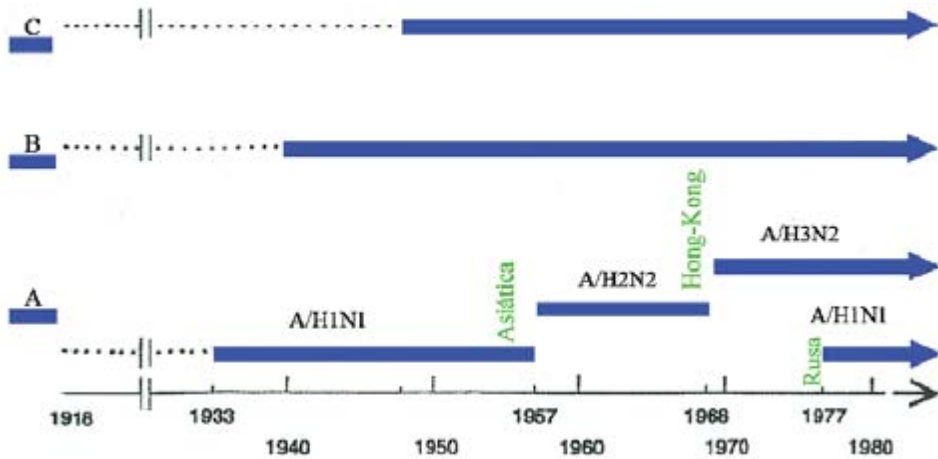


FIGURA 2. *CRONOLOGÍA DE PANDEMIAS/EPIDEMIAS provocadas por diversos subtipos de gripe A y por los tipos B y C. Las líneas en azul continua señalan los periodos de pervivencia de los tipos/subtipos indicados, correspondientes a datos obtenidos después de una caracterización de los antígenos víricos. Las líneas de puntos manifiestan que los virus no han sido conservados, y que los datos de su actividad son solamente indirectos. Un caso especial ha sido la reaparición del subtipo H1N1, que no estaba en circulación en 1976 entre los humanos, pero sí en el cerdo, y que perdura en nuestros días. Asimismo, se considera que la pandemia de gripe de 1918-1919 pudo tener su origen a partir de variantes existentes en las aves, tanto domésticas (pavos y otros) como silvestres (especialmente patos), que pueden contribuir a la aparición de nuevos subtipos o variantes, favorecidos los intercambios en este caso en los sitios de confluencia de las migraciones. El subtipo H2N2 desapareció en 1968, al aparecer el H3N2 (según Cabezas y Hannoun, 1990).*

¿Pueden correlacionarse estas **variaciones** con modificaciones en las glicoproteínas hemaglutinina y/o **sialidasa**?

Limitándonos a la segunda, un estudio sobre este tema podría centrarse en aspectos como los referentes a la estructura química, antigenicidad, posibles cambios de los aminoácidos próximos al sitio activo o de este sitio, etc., de dicha glicoproteína.

Dirigir la atención hacia el aspecto funcional de la propia actividad de la enzima puede ser otro enfoque del problema; o sea, averiguar si se aprecian cambios en la actividad sialidásica de los distintos tipos y subtipos de virus circulantes en un mismo período de tiempo. Para ello, resulta muy conveniente determinar no sólo sus actividades sino, además, comparar sus respectivos parámetros cinéticos tales como: pH

óptimo, estabilidad a tratamientos térmicos, constante de Michaelis ( $K_m$ ), velocidad máxima de la reacción catalizada por la enzima ( $V_{m\acute{a}x}$ ) y constante de inhibición frente a ciertos agentes ( $K_i$ ).

Para tres cepas de virus de la gripe tipo A (todas ellas pertenecientes al subtipo H3N2), y tres cepas del tipo B, circulando todas ellas en el período comprendido entre 1983 y 1986, se ha encontrado (Cabezas *et al.*, 1989):

- Que la actividad sialidásica es más elevada para las tres cepas A que para las tres B.
- Que todas presentan el pH óptimo a un valor 5,0; pero las B muestran, además, otro máximo próximo a 7,5.
- Que los valores de  $K_m$ ,  $V_{m\acute{a}x}$ , y cociente  $K_m/V_{m\acute{a}x}$  de las cepas A se alejan de los respectivos de las cepas B, habiéndose usado para las determinaciones dos sustratos (uno natural y otro sintético).
- Por el contrario, la termostabilidad y los valores de las  $K_i$  son relativamente próximos entre todas las cepas analizadas.

¿Qué podría deducirse de estos resultados?: Sin entrar en detalles, se podría aventurar que los cambios producidos en el patrón evolutivo de ambos tipos, A y B, de virus de la gripe son diferentes, por lo menos en algunos aspectos; y que estos cambios determinan una mayor «eficacia» para la sialidasa del tipo A que para la del B. No obstante, dichos cambios no afectarían al comportamiento frente a inhibidores.

¿Y en cuanto a los subtipos A?: Los resultados obtenidos (Cabezas *et al.*, 1985) señalan que las diferencias en la sialidasa (según los mismos parámetros indicados) serían menores entre los tres subtipos analizados (H1N1, H2N2, H3N2) que las halladas entre dichos subtipos del tipo A y el tipo B.

#### **2.4. Comparación entre la actividad sialidásica del subtipo A (H1N1) de procedencias humana, porcina y aviar**

Además de los mecanismos de *deslizamiento* o *deriva* y *salto anti-génicos brusco*, los virus de las gripes disponen (para su bien lograda pervivencia) de otros mecanismos como son los de su permanencia en especies distintas de la humana, donde (hasta el año 2005) (Cabezas, 2006) no ocasionaban graves enfermedades, convirtiéndose dichas especies (de mamíferos y aves) en verdaderos «reservorios víricos». Así, el cerdo, dada su relativamente corta vida media, garantiza a los virus su continuidad, una vez desaparecidos en pocos años los animales inmunizados. En algunas zonas de Asia, con gran proximidad en la vida ordinaria entre el hombre y el cerdo, se pueden hallar facilitados estos contagios.

Por otro lado, las aves, en especial las que realizan grandes vuelos migratorios como los patos silvestres, contribuyen a la difusión de los virus. Téngase en cuenta que, además, pueden anidar en sitios cercanos a los de las aves de corral (gallinas, patos domésticos, etc.), con lo que las posibilidades para los contagios son grandes.

Aunque con ciertas restricciones, se admite actualmente que no hay barreras interespecíficas para la gripe (Fiszon, 1988), pudiéndose producir también contagios entre mamíferos y aves. Sin embargo, ello no quiere decir que la patogenicidad sea la misma para las distintas especies. Así, el hurón es muy sensible a los virus de la gripe, mientras el caballo, por ejemplo, soporta mucho mejor esta enfermedad.

Siendo la vía principal de penetración (aunque no la única) el tracto digestivo para los virus de la gripe en las aves —teniendo que soportar así condiciones particularmente más ácidas de pH y temperaturas superiores (40-41° C) que en los mamíferos—, ¿tendrán alguna repercusión estas circunstancias en las peculiaridades de la sialidasa de una y otra procedencia? O, lo que es equivalente, ¿determinarán los mecanismos evolutivos cambios en las características de la enzima que se acusen en sus propiedades cinéticas, por ejemplo?

Estudios efectuados comparativamente con muestras de sialidasa procedentes de patos migradores capturados en el noreste de Francia por C. Hannoun (Instituto Pasteur, París), principalmente el ánade real (*Anas*

*platyrhincos*, pero también *Anas acuta* y *Tadorna tadorna*), de cerdos y de humanos, han mostrado (Fiszon *et al.*, 1989; Cabezas, 2004) que la termostabilidad máxima (a 40° C) corresponde a la sialidasa de dichos patos, siendo la menor la correspondiente a la de los cerdos e intermedia para la de los seres humanos. La resistencia a los cambios de pH determinada en la sialidasa de estas tres procedencias dio resultados paralelos (Fiszon *et al.*, 1989). Puede aceptarse que estos resultados muestran el efecto de mecanismos de adaptación, en el caso de las aves, que han favorecido modificaciones ocasionadas por circunstancias desfavorables. [Datos relativos a los virus causantes de la «gripe del pollo» (años 1983-2004), pueden hallarse en la publicación de la referencia Cabezas, 2004; y otros más recientes, en las de Cabezas, 2005 y Cabezas, 2006].

### 3. ACETILESTERASA DEL VIRUS DE LA GRIPE TIPO C

Aunque ya desde 1949 se sabía que el virus de la gripe tipo C difería notablemente respecto a los A y B (los cuales presentaban gran similitud entre sí), se ha progresado lentamente en su conocimiento. Dos circunstancias han contribuido a este retraso: la menor patogenicidad del virus tipo C, y la dificultad para su propagación artificialmente en los medios de cultivo, en comparación con los A y B.

No obstante, en 1969 Kendal *et al.*, propusieron que las espículas del virus tipo C de la gripe serían probablemente *proteinaceus*; y el mismo Kendal sugirió en 1975 que dicho virus podría contener o bien una neuraminidasa de especificidad inhabitual o bien una enzima con actividad diferente a la de ésta. La ausencia de actividad sialidásica en dicho tipo de virus fue dada a conocer por Nerome *et al.*, en 1976.

Desde mediados de la década de 1980, a partir de los trabajos de Herrler *et al.* (1988a y 1988b), se sabe que no es el ácido *N*-acetilneuramínico sino el *N*-acetil-9-*O*-acetilneuramínico el receptor del virus de la gripe tipo C, cuyo virus posee una actividad (destructora de dicho receptor) de tipo esterásico (exactamente *O*-acetilesterásico) análoga a la glicosidásica propia de la sialidasa de los tipos A y B, con lo que se garantiza la liberación ulterior del virus. Realmente la actividad hidrolítica la efectúa una glicoproteína peculiar, que posee triple actividad: hemaglutinante, esterásica, y de fusión; por ello se la conoce como HEF.

### **3.1. Especificidad de la *O*-acetilesterasa y peculiaridades del virus de la gripe tipo C**

Trabajos efectuados en nuestro laboratorio (García-Sastre *et al.*, 1991) acerca de la especificidad de esta enzima usando numerosos sustratos de estructura muy diversa, tanto acíclicos como cíclicos, naturales y sintéticos (que no contienen residuos de ácidos siálicos), han mostrado que tales sustratos pueden ser hidrolizados, con mayor o menor facilidad, por dicha enzima. Es decir, la especificidad de ésta es poco estricta; lo que le permite actuar sobre sustancias de composición química bastante diferente, con tal de tener grupos *O*-acetilo en ciertas posiciones.

Una publicación del equipo de R. Schauer (en Alemania) y la de nuestro laboratorio (García-Sastre *et al.*, 1991) son las dos únicas referencias-tipo con que aparece incluida esta enzima, por primera vez, en la Nomenclatura Oficial de Enzimas, con el número EC. 3.1.1.53, y con la denominación de *sialate O-acetylerase* (= sialato-*O*-acetilesterasa) o, abreviadamente, *O*-acetilesterasa.

Por otro lado, la existencia de siete segmentos de ARN en el tipo C, a diferencia de los ocho peculiares de los tipos A y B del virus de la gripe, así como su carencia de actividad sialidásica (propia de éstos), muestran las notables diferencias entre el C respecto a los A y B, a pesar de figurar los tres como pertenecientes al mismo género. Razonablemente, esas peculiaridades aconsejan el considerarlo como un nuevo género, intermedio entre Ortomixovirus (puesto que contiene genoma segmentado) y Paramixovirus (con alguno de los cuales comparte características comunes, como la glicoproteína HEF). Por ello, se propuso (Cabezas *et al.*, 1991) estudiar la posibilidad de separarlo del A y del B, y asignarle un nuevo género en la clasificación oficial de virus.

### **3.2. Infección por virus tipo C de la gripe en seres humanos y en perros en Salamanca**

Dado el escaso peligro que para la población humana representan las infecciones por este tipo de virus, escasean los estudios epidemiológicos al respecto. Probablemente uno de los más antiguos sea el efectuado, en EE.UU., en 1952.



En colaboración con el Instituto Pasteur de París (Profesor C. Hannon), en 1993, determinamos (Manuguerra *et al.*, 1994) —muy probablemente, por primera vez en España— en muestras de 191 personas aparentemente sanas, habitantes de Salamanca, la presencia o no de anticuerpos frente al virus de la gripe tipo C, mediante pruebas de hemaglutinación-inhibición y de hemaglutinación. Resultados positivos con el primer test se detectaron en un porcentaje relativamente elevado de los sueros analizados (un 60%, aproximadamente), encontrando los valores más altos entre las personas de 16 a 50 años.

De forma similar, en 101 perros procedentes de las provincias de Salamanca y Burgos, usando las mismas técnicas que para los humanos, hallamos en un 56% de las muestras resultado positivo, con valores elevados también (Manuguerra *et al.*, 1993).

La eventual importancia de esta investigación puede radicar en que, mediante ella, se comprueba que este tipo de virus, considerado hasta hace poco tiempo como exclusivo de la especie humana, puede hallarse en otros mamíferos como el perro, habiéndose también señalado su presencia en cerdos y hasta en aves (Manuguerra *et al.*, 1993). (La conexión entre las actividades de virus de la gripe tipos A y B con la del C se indica en la sección 3.4.)

### **3.3. Variación en la actividad biológica de la acetilesterasa del virus de la gripe tipo C**

De modo similar a como se estudió la variación en cepas de los virus de la gripe tipos A y B (sección 2.3), hemos tratado de comparar entre sí la actividad y ciertos parámetros cinéticos de la *O*-acetilesterasa de cinco cepas del virus tipo C, con objeto de investigar si los previsibles cambios detectables en ellas pudieran estar relacionados con la capacidad de propagación del virus (Sánchez-Bernal *et al.*, 1992).

En resumen, se hallaron notables diferencias en la actividad enzimática y en los valores de  $K_m$ ,  $V_{m\acute{a}x}$ , y  $V_{m\acute{a}x}/K_m$  entre ciertas cepas, así como en su termoestabilidad a 40° C. Por el contrario, sus cifras de pH óptimo, estabilidad a diferentes valores de pH y estabilidad a 4° C fueron similares.

Por tanto, un cierto grado de variación entre ellas sí parece apreciarse; lo que sugeriría la existencia de una capacidad de adaptación a diversas circunstancias por parte del virus de la gripe tipo C.

### **3.4. Repercusión de la actividad *O*-acetilesterásica de los virus de la gripe tipo C en la actividad sialidásica (y en la capacidad de propagación) del virus tipo A**

Todo lo anterior referente al virus de la gripe tipo C puede servir de apoyo para el aspecto aplicado que se indica a continuación, contestando a la importante pregunta siguiente:

¿Hasta qué punto la actividad biológica de éste condiciona la actividad biológica (capacidad de infección, propagación, etc.) del virus tipo A (y de su muy próximo, el tipo B) de la gripe?

Venía admitiéndose, como aceptable hipótesis, la posibilidad de que la actividad del virus tipo C facilitara la del A (y, verosimilmente, también del B). Pero el primer estudio experimental que ha comprobado tal hipótesis es el que se resume seguidamente:

Cuando incubamos en nuestro laboratorio (Muñoz-Barroso *et al.*, 1992) muestras de virus de la gripe tipo C (procedentes del Instituto Pasteur de París) con sustratos naturales (principalmente glicoproteínas) conteniendo precisamente los ácidos *N*-acetil-9-*O*-acetilneuramínico y ácido *N*-acetilneuramínico, y sometimos seguidamente el producto resultante de la acción *O*-acetilesterásica de dicho virus C a la actividad sialidásica del virus de la gripe tipo A (H1N1 o H3N2) se obtuvo una liberación de ácido *N*-acetilneuramínico de una cuantía entre doble y triple respecto a la conseguida cuando se impidió actuar por inactivación térmica previa al virus C.

De ello se deduce que dicho virus tipo C, si precede en su actividad al virus A (y verosimilmente al B), favorecerá la actividad de éstos —al facilitar la accesibilidad de contacto entre enzima y sustrato—, con lo que contribuirá de una forma indirecta pero eficaz a una mayor propagación de ellos. Por tanto, cabe señalar que el virus tipo C de la gripe puede tener mayor importancia epidemiológica de la que suele atribuírsele habitualmente.

#### 4. INFLUENCIA DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS VIRUS DE LA GRIPE H5N1 EN SU PATOGENICIDAD

El complejo fenómeno de la patogenicidad vírica que se presenta más o menos acentuado en unas cepas que en otras (siendo especialmente intensa en el subtipo H5N1) puede ser interpretado como el resultado de alteraciones producidas en algún o algunos componentes de los virus.

Recuérdese que en la superficie de los virus de la gripe tipo A (Fig. 3) se sitúan las glicoproteínas denominadas **hemaglutinina (HA o H)** —distribuida amplia y uniformemente sobre ella—, y **neuraminidasa (= sialidasa, EC 3.2.1.18)** localizada de forma irregular, «arracimada» y en menor proporción que la precedente. Rodeando todo lo interior se halla la bicapa lipídica, cuyos componentes proceden de la célula hospedadora. Más hacia adentro se sitúan las **proteínas M1 y M2**, que constituyen la matriz de dicha estructura, siendo función de la M2 la de actuar como conducto o canal de protones que permite la acidificación del medio.

También en el interior se hallan las proteínas no estructurales **NS<sub>1</sub>** y **NS<sub>2</sub>**, así como las **nucleoproteínas NP** y el **ARN**; éste es de polaridad negativa, fragmentado en ocho segmentos (en los tipos A y B, siete en el C). Finalmente, hay tres polimerasas: la **PB2** (polimerasa básica 2), la **PB1** (polimerasa básica 1) y la **PA** (polimerasa ácida). (Otros datos relacionados pueden consultarse en las publicaciones de las referencias Cabezas, 1990; Cabezas y Hannoun, 1990; Cabezas, 2004; y, en lo concerniente a la hemaglutinina, en las referencias Cabezas, 1991b; Cabezas, 2005; Cabezas, 2006).

Ejemplos de la influencia de la composición de los virus de la gripe tipo A en los fenómenos de la patogenicidad pueden ser los siguientes:

Webster *et al.*, en 1998, hallaron en cepas altamente patogénicas H5N1 de virus humano Hong Kong 97 que todos los segmentos de sus genes estaban estrechamente relacionados con los de pollos Hong Kong 97, pero que había diferencias entre ambos en la reactividad antigénica de la **hemaglutinina**, según indicaba el test de inhibición de dicha glicoproteína.

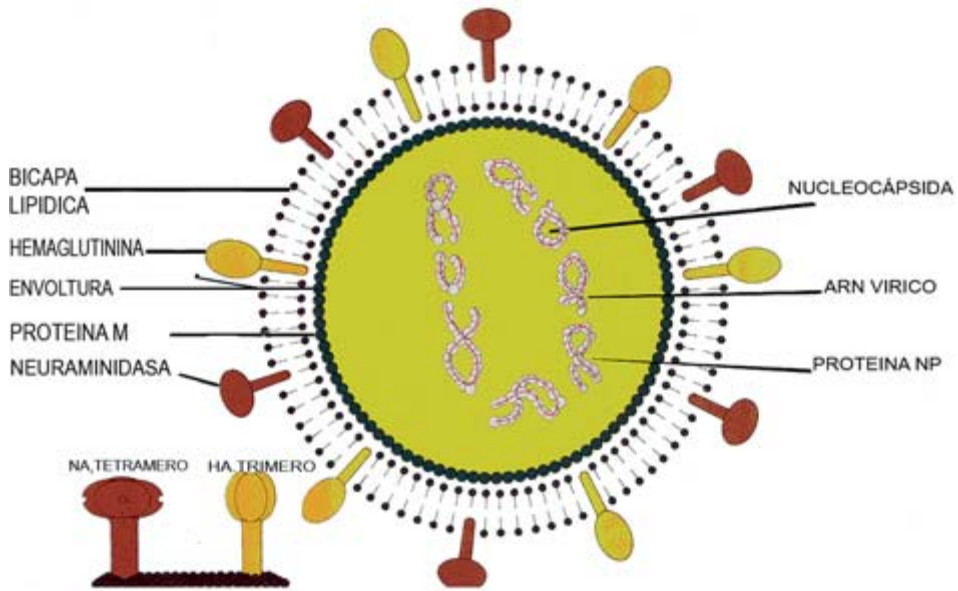


FIGURA 3. ESQUEMA DE LA ESTRUCTURA DEL VIRUS DE LA GRIPE TIPO A, con indicación de sus componentes mejor conocidos. Los segmentos de ARN números 1, 2 y 3 se hallan relacionados, respectivamente, con la polimerasa básica 2 (PB2), la polimerasa básica 1 (PB1) y la polimerasa ácida (PA). El número 4 codifica la biosíntesis de la hemaglutinina (HA); el número 5, la de la nucleoproteína integrante de la nucleocápsida; el número 6, la neuraminidasa (NA); el número 7, la de las proteínas M1 y M2, componentes de la matriz de la envoltura, y el número 8, la de las proteínas no estructurales, NS1 y NS2. Las actividades de la HA y de la NA radica en los «cráteres» o cavidades de sus cabezas. El monómero de la HA puede efectuar la «fusión» del virus con la membrana de la célula hospedadora. Para la NA sólo el tetramero es la forma activa, cuya función principal estriba en la liberación de los viriones recién formados, evitando su acumulación (según Cabezas y Hannoun, 1990).

En 2001, Hatta y col., mediante ensayos de genética inversa, observaron que «una mutación en la posición 627 de la proteína **PB2** influía en la aparición de la infección en ratones; ahora bien, era esencial, para que la infección fuera letal, que hubiera una elevada capacidad de escisión de la glicoproteína **hemaglutinina**» (siendo esta cualidad dependiente del mayor contenido de aminoácidos básicos en la zona del péptido de fusión de la hemaglutinina).

Li (con Webster y otros) (Li *et al.*, 2004), señalaron que, habiendo surgido un genotipo H5N1 dominante (Z) en pollos y patos, era precisa-

mente ése el responsable del brote epidémico de 2003-04; y que la delección de 20 aminoácidos en la molécula de la **neuraminidasa (NA)** podría estar relacionada con la adaptación del virus de la gripe H5N1 a aves de corral. Asimismo, una delección de cinco aminoácidos se había producido en la **proteína no estructural NS<sub>1</sub>**. Y añadían: «Desde enero de 2002, el genotipo Z, que contiene las delecciones **NA** y **NS<sub>1</sub>**, ha llegado a ser el virus H5N1 dominante en el sur de China» (Li *et al.*, 2004).

En 2005, Liu *et al.*, confirmaban, en dicho virus H5N1, asociada a su alta virulencia: a) la abundancia de aminoácidos básicos (arginina y lisina, sobre todo) en el sitio de escisión de la **hemaglutinina**; b) la virulencia del gen de la **PB2**; y c) la delección de 20 aminoácidos (en las posiciones 49 a 69) en la **neuraminidasa**.

Normile, en 2006, indicaba que cualquier «gen desempeña un papel decisivo en la evolución y biología del virus de la gripe». Por lo que no era sorprendente el hecho de que hubiera una gran variabilidad en los genes de la **hemaglutinina** y de la **neuraminidasa**, así como en los de las proteínas no estructurales **NS<sub>1</sub>** y **NS<sub>2</sub>**.

Acerca de esta última, Geiss y col. (2002) han encontrado que «la **NS<sub>1</sub>** del virus de la gripe A contribuye a la patogenicidad vírica capacitando al virus para desarmar el sistema defensivo tipo **interferón** de la célula hospedadora. [...]. La proteína **NS<sub>1</sub>** reprime la respuesta antivírica de la célula hospedadora por múltiples mecanismos». Entre éstos se encuentra el de la inhibición de la **proteín-quinasa** (regulada por el ARN).

Recientemente, se ha mostrado la importancia del complejo de la polimerasa (proteínas **PB2**, **PB1** y **PA**) y de la nucleoproteína **NP** en el papel de mediadores en el proceso de adaptación de cepas de virus aviares a hospedadores mamíferos (Gabriel *et al.*, 2005).

A su vez, la capacidad de adaptación de los virus a la célula hospedadora, reconociendo **distintos receptores** integrados por el ácido *N*-acetilneuramínico, es otro mecanismo que puede influir en la patogenicidad de los virus de las gripes aviar y humana (Cabezas, 2005; Cabezas, 2006; Weiss *et al.*, 1998). Ahora bien, últimamente se ha indicado por Kawaoka *et al.* (de la Universidad de Wisconsin, Madison, EE.UU.) que existen diferencias notables en cuanto a que hay carencia de capacidad para realizarse una unión entre los receptores del tracto respiratorio superior (nariz y faringe) con los virus H5N1; y, por el contrario, sí

habría facilidad para hacerse entre los receptores del tracto inferior (bronquios y pulmón). Ello permitiría al virus aviar reproducirse en los pulmones de los seres humanos, pero no contribuiría a su propagación por estornudos o toses; es decir, la posibilidad de contagio por este mecanismo sería menor de lo que podría temerse (Shinya *et al.*, 2006).

Resultados muy similares son los de Kuiken *et al.*, que (igualmente que los de Kawaoka) han sido resumidos por Normile (Normile, 2006).

Otros trabajos relacionados han sido realizados recientemente por otros autores (Kogure *et al.*, 2006; Glaser *et al.*, 2006; Russell *et al.*, 2006). Los gangliósidos, sin embargo, no se considera que sean indispensables para la entrada del virus en la célula (Matrosovich *et al.*, 2006).

Asimismo, estas diferencias pueden estar relacionadas con los distintos tipos de células del tracto respiratorio, dada la diversa índole de sus receptores (Cabezas, 2004; Cabezas, 2006).

Pero no solamente mutaciones que afecten a un componente del virus —por ejemplo, la neuraminidasa— pueden incidir en el incremento de la patogenicidad vírica, sino que pueden también repercutir en la actividad peculiar de algún otro constituyente de dicho virus. Así, la **neuraminidasa** (además de su principal función liberadora de los viriones de la superficie de la célula hospedadora) puede contribuir a acrecentar la concentración de plasminógeno (Goto y Kawaoka, 1998), que es un precursor de una proteasa que favorece la acción hidrolítica necesaria para el funcionamiento de la **hemaglutinina**; o por mecanismos en que está implicada la proteína NS<sub>1</sub>, en la que se ha producido una sustitución del ácido aspártico 92 por ácido glutámico (WHO, 2005).

En resumen: a) Diferentes genes pueden influir en la patogenicidad de los virus de la gripe tipo A, al condicionar la función de diversos componentes del virus. b) Puede bastar la sustitución en una proteína vírica de un solo aminoácido, a causa de una de estas mutaciones, para que la patogenicidad resulte aumentada (o disminuida).

## 5. DIAGNÓSTICO RÁPIDO DE SUBTIPOS DE VIRUS DE LA GRIPE

Para que el tratamiento de la gripe con fármacos como el zanamivir o el oseltamivir (véase sección 6.2) sea eficaz, se considera indispensable que se inicie lo antes posible; y, en todo caso, dentro de las 48 horas primeras desde el comienzo de la enfermedad. Ello obliga a detectar con seguridad si la afección que se padece es realmente gripe y no alguna otra cuyos síntomas pueden ser a lo menos parcialmente coincidentes, como ocurre con catarros, etc. Interesa, por tanto, obtener un diagnóstico rápido y suficientemente seguro, sin perjuicio de realizar además, si fuera necesario, pruebas adicionales, tales como el aislamiento del virus, caracterización de su hemaglutinina, etc. (pero que emplean más tiempo).

Ya desde hace algunos años se dispone de técnicas como las basadas en la medida de la actividad de la transcriptasa inversa y reacción en cadena de la polimerasa (*reverse-transcription polimerase chain reaction*, RT-PCR), específica de la hemaglutinina H5 —y, por tanto, útil en el diagnóstico del virus H5N1—, que puede realizarse en muestras del tracto respiratorio.

*«A commercially available immunoassay was more sensitive than direct immunofluorescence for rapid viral diagnosis. Direct immunofluorescence with an H5-specific monoclonal antibody pool was useful for rapid exclusion of H5-subtype infection»* (Yuen *et al.*, 1998).

Pero otros subtipos también pueden ser determinados. Así, fragmentos del gen de la hemaglutinina de los 15 subtipos conocidos en el año 2003 —actualmente son 16— pueden ser identificados con esta finalidad, por el procedimiento de *«nucleic acid sequence-based amplification (NASBA)»* (Lau *et al.*, 2003), mediante un ensayo que es también «sensible y altamente específico» (Lau *et al.*, 2003).

Por otro lado, en el año 2001 se advirtió «que se necesitan tests de diagnóstico verdaderamente rápidos, sensibles, sencillos y baratos en relación con los inhibidores de la neuraminidasa, para ser usados eficazmente por el público. [...] Un test de estas características [está] en fase de desarrollo [en Oklahoma, EE.UU.]. Utiliza un grupo indicador luminescente y una película polaroid, y es altamente seguro y apropiado para su uso en las farmacias locales» (Laver y Garman, 2001).



Ya en 1984, una publicación de nuestro laboratorio (Cabezas *et al.*, 1984) dio a conocer el procedimiento puesto a punto por nosotros, fundado en la valoración del NADH por técnica bioluminiscente (véase sección 2.2), que siendo un «*microassay which is specific, rapid, simple and ultra-sensitive, is a measure for amounts as little as (at least) 5 pmol of N-acetilneuraminic acid [...] directly in intact virus*».

Otros ensayos (o intentos de ensayos), más o menos ingeniosos, también han sido propuestos; como el basado en el empleo de anticuerpos específicos que muestran cambios en su conductancia al unirse los virus de la gripe A con dichos anticuerpos en la superficie de campos de magnitud *nano* con efecto transistor.

Todo lo anterior autoriza a plantear preguntas como éstas:

- ¿Se podría, en un plazo breve, eliminar por completo la gripe?
- En caso contrario, ¿serán las futuras epidemias/pandemias responsables de una elevada mortalidad en los seres humanos, y/o las epizootias en algunas especies de animales?
- ¿Se dispone de fármacos capaces de impedir estos riesgos?

Al terminar de exponer las secciones siguientes, quizá pueda encontrarse una contestación, siquiera sea parcial, a dichas cuestiones.

## 6. AGENTES ANTIGRIPALES

### 6.1. Ciclo biológico del virus de la gripe

El virus de la gripe desarrolla su ciclo biológico según dos situaciones bien diferentes: En el medio extracelular, sometido a las circunstancias del ambiente (radiaciones, cambios de pH o de temperatura, etc.), que incluso pueden llegar a destruirlo; y en el intracelular, dependiendo de la vida de la célula que lo hospeda (pero condicionándola también).

Este segundo periodo consta de numerosas etapas (Cabezas y Hannon, 1990), que pueden ser agrupadas (con cierta aproximación), para nuestros fines, en las tres fases siguientes:



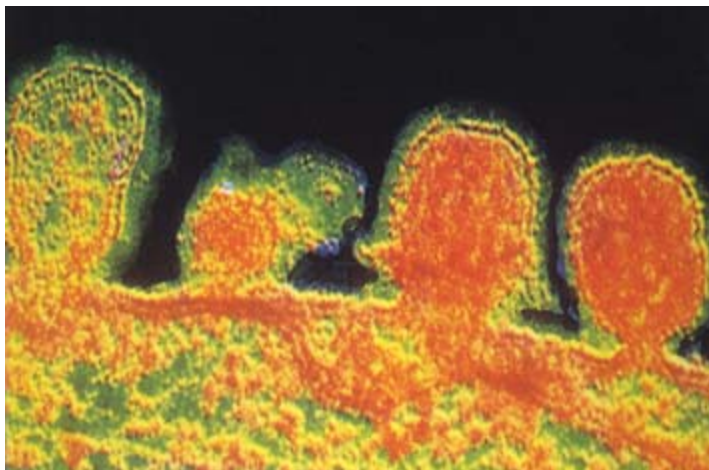


FIGURA 4. *VIRIONES surgiendo de la célula hospedadora (cortesía de GEIG, París).*



FIGURA 5. *VIRUS DE LA GRIPE TIPO A (fotografiado al microscopio electrónico a un aumento de 500.000 veces) (cortesía de GEIG, París).*

- 1.<sup>a</sup> Fijación selectiva y penetración del virus en la célula (Cabezas, 2004), seguida de la descapsidación de éste.
- 2.<sup>a</sup> Expresión y replicación del genoma vírico; lo que determinará la formación de los constituyentes del virus, a expensas de los de la célula (la cual queda gravemente dañada).
- 3.<sup>a</sup> Ensamblaje de los constituyentes víricos recién formados integrantes del virión, el cual emergerá por gemación a la superficie externa de la célula, de donde será liberado por acción de la neuraminidasa. Dicha enzima corta la unión de los residuos receptores constituidos por el ácido *N*-acetilneuramínico existentes en las superficies celular y vírica, evitando el acúmulo de los viriones sobre la superficie de la célula y también que queden unidos entre sí («arracimados») (Gubareva *et al.*, 2000).

Además, puede ayudar al movimiento del virus a través de las mucinas del tracto respiratorio, fluidificando éstas; puede contribuir asimismo a promover la producción exagerada de citoquinas, dotadas de poder proinflamatorio; y, por último, puede reforzar la acción de la hemaglutinina, por secuestrar y acumular plasminógeno, según ya se indicó anteriormente.

Se confirma, pues, la importancia de bloquear la plural y decisiva actividad de la neuraminidasa, si se desea interrumpir el ciclo de los virus de la gripe y su propagación.

## **6.2. Inhibidores de la neuraminidasa disponibles como fármacos antigripales: Zanamivir (= «Relenza») y oseltamivir (= «Tamiflu»)**

*«The impact of influenza infection is felt globally each year when the disease develops in approximately 20 percent of the world's population. [...] Recent events, including human cases of avian influenza, have heightened awareness of the threat of a pandemic and have spurred efforts to develop plans for its control. [...] Although vaccination is the primary strategy for the prevention of influenza, there are a number of likely scenarios for which vaccination is inadequate, and effective anti-viral agents would be of the most importance. [...] In contrast*

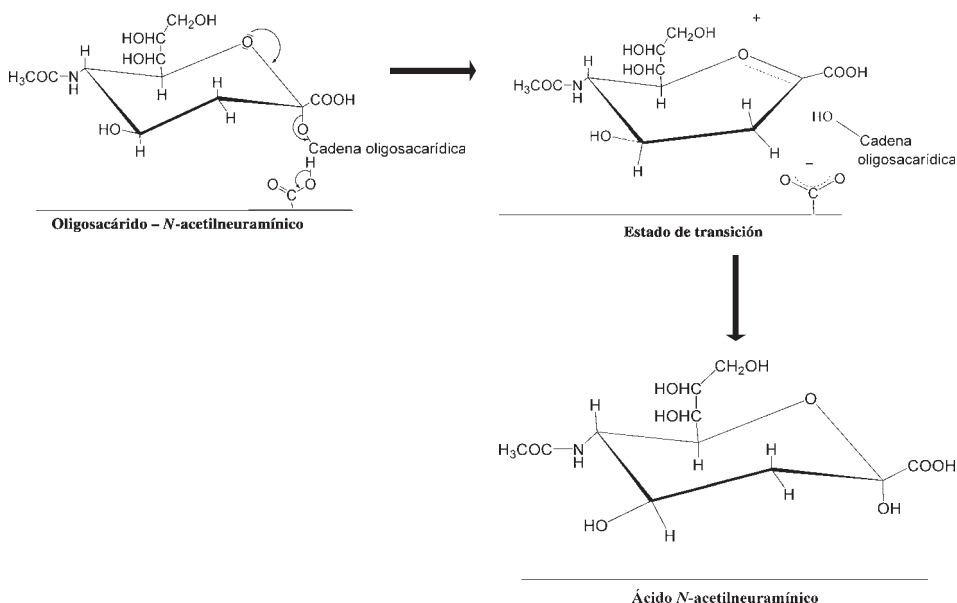
*to the adamantanes [amantadine and rimantadine] the neuraminidase inhibitors (zanamivir = «relenza» and oseltamivir = «tamiflu») are associated with very little toxicity [...and] are effective against all neuraminidase subtypes.*

(A. MOSCONA, *N. Engl. J. Med.* 2005).

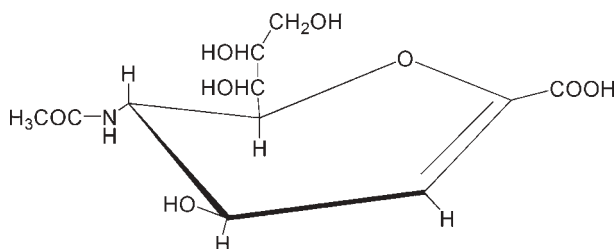
Desde el punto de vista bioquímico resultaba atractiva, ya desde la década de 1970, la idea de poder bloquear la actividad de la neuraminidasa o sialidasa (EC. 3.2.1.18) con agentes inhibidores, según alguno de los mecanismos de la inhibición enzimática.

— Así, inicialmente se ensayó el propio producto de la reacción, el **ácido *N*-acetilneuramínico**, como posible inhibidor.

Se obtuvo inhibición, pero de escaso interés práctico, como era previsible, dado el carácter reversible del proceso, el rápido catabolismo de dicho producto, etc. Sin embargo, el estudio de la cinética de la reacción facilitó el conocimiento detallado de la formación de un compuesto correspondiente al estado de transición de la reacción que resultó ser muy útil más adelante. He aquí las fórmulas del sustrato (oligosacárido con ácido *N*-acetilneuramínico terminal), del compuesto de transición y del producto final de la reacción (el ácido *N*-acetilneuramínico):



— En 1974, se obtuvieron valores esperanzadores en cuanto a inhibición, en cultivos celulares, utilizando en los ensayos un análogo estructural del compuesto correspondiente al estado de transición de la reacción enzimática (indicada en el esquema precedente), cuyo parecido con él es notable. Dicho análogo es el ácido **2-desoxi-2,3-deshidro-*N*-acetilneuramínico**, también denominado **Neu5Ac2en**, y más abreviadamente **DANA** (Meindl *et al.*, 1974):



Se acepta actualmente que el mayor efecto inhibitor del DANA respecto al causado por el ácido *N*-acetilneuramínico se debe a que aquél se comporta como un inhibidor del compuesto correspondiente al estado de transición catiónico del sustrato indicado en el esquema anterior.

Ahora bien, al ser excretado con excesiva rapidez en las pruebas con ratones, el Neu5Ac2en o DANA no producía *in vivo* el deseado efecto inhibitor.

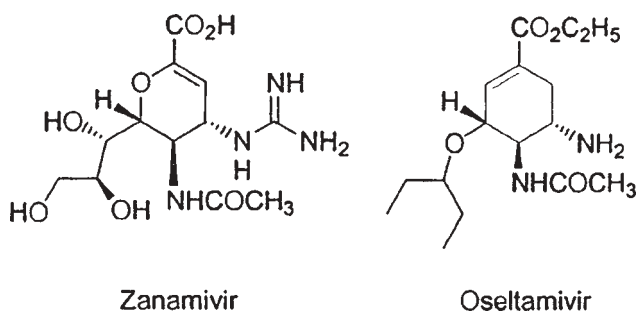
— Dos años después, Palese y col. (Palese y Compans, 1976) consiguieron incrementar ese efecto inhibitor con el derivado fluorado del DANA: el **ácido 2-desoxi-2,3-deshidro-*N*-trifluoracetilneuramínico (FANA)**. Probablemente, éste ha sido el compuesto de mayor actividad inhibitora encontrado entre los estudiados antes de conocerse en 1983 la estructura tridimensional de la neuraminidasa. Pero, su toxicidad y su falta de actividad *in vivo* relegaron su eventual aplicación.

— A partir del conocimiento preciso de la composición en aminoácidos del sitio activo y sus zonas próximas, y de la estructura tridimensional de la neuraminidasa del virus de la gripe tipo A, logrado por Colman y col. y publicado en 1983, se han podido diseñar racionalmente inhibidores para la neuraminidasa del virus de la gripe (von Itzstein *et al.*, 1993). Resumiendo lo esencial de los resultados conseguidos, puede

considerarse que dichos inhibidores actualmente son: el **zanamivir** (registrado comercialmente con el nombre de «**relenza**» por la compañía GlaxoSmithKline/Biota), que corresponde al agente inicialmente conocido como GG 167, y el **oseltamivir** (= GS 4104 y GS 4071), descrito por Kim y col. (Kim *et al.*, 1997), y comercializado por Gilead/Hoffmann La Roche con la denominación de «**tamiflu**».

Hasta la fecha, son los dos fármacos de tipo inhibidor de la neuraminidasa aprobados por las autoridades sanitarias para su uso. (Otros, relacionados, se hallan en fases previas de ensayos clínicos, más o menos avanzadas; véase más adelante.)

¿Cuál es la composición de estos dos medicamentos?: Las fórmulas estructurales son las siguientes:

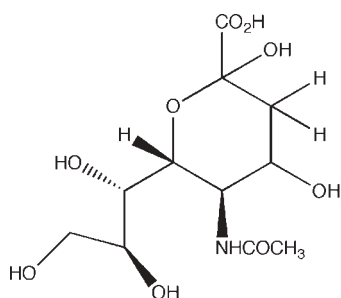


El zanamivir es el ácido 4-guanidín-2-desoxi-2,3-deshidro-*N*-acetilneuramínico; o abreviadamente, 4-guanidín-Neu5Ac2en.

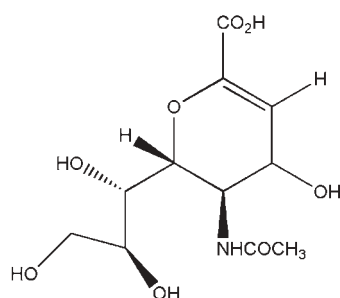
En el caso del oseltamivir, el anillo heterocíclico del zanamivir queda reemplazado por uno ciclohexénico; el grupo carboxilo es reemplazado por su éster etílico; el resto (hidrofílico) del glicerol es reemplazado por otro,  $\text{CH}_3\text{--CH}_2\text{--CH--CH}_2\text{--CH}_3$ , que intensifica el carácter lipofílico del conjunto; y el grupo guanidino es reemplazado por un  $\text{--NH}_2$ . Realmente el carácter lipofílico de esta molécula garantiza el que pueda atravesar la barrera digestiva —circunstancia que no sucede con el zanamivir—, siendo un profármaco (el GS 4104) el que se convierte en la forma activa (GS 4071) por acción de las esterasas hepáticas.

¿Tienen parecido estructural zanamivir y oseltamivir con el ácido *N*-acetilneuramínico y con el NeuAc2en (DANA)?:

La comparación de las fórmulas estructurales de estos cuatro compuestos permite comprobar la gran similitud existente entre el zanamivir y los dos últimos (dibujando sus fórmulas como se indica seguidamente se aprecia mejor dicha similitud):

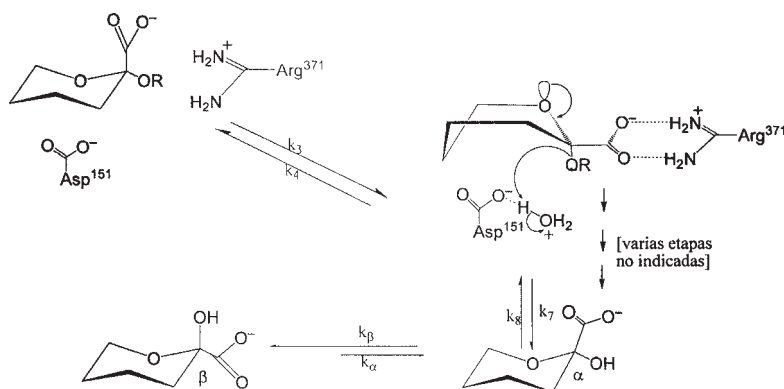


Ácido *N*-Acetilneuramínico



Neu5Ac2en (DANA)

El mecanismo de la hidrólisis del sustrato por acción de la sialidasa «requiere la formación de un estado intermedio de transición [que es] un catión sialosilo endocíclico» (Chong *et al.*, 1992). Este compuesto intermedio «es también compatible con la estructura cristalina [deducida] por rayos X del complejo sialidasa- $\alpha$ NeuAc. [...] La unión del sustrato incluye una arginina 371 protonada. Las gráficas por estudios con ordenador del sitio activo de la sialidasa muestran que la carga positiva del estado de transición del catión sialosilo podía estar estabilizada por los carboxilatos vecinos, en particular por el aspártico 151» (Chong *et al.*, 1992).



Un importante aspecto de este asunto es que la profunda cavidad que constituye el sitio activo de la enzima contiene «aminoácidos que son una invariante en las sialidasas de todas las cepas de virus de la gripe A y B que han sido caracterizadas hasta la fecha» (von Itzstein *et al.*, 1993).

Otro aspecto también interesante del sitio activo es que dicha «invariancia se extiende a algunos aminoácidos que no contactan ellos mismos con el ácido siálico sino que proveen de una subestructura o andamio que soporta a los aminoácidos que contactan con el glúcido» (von Itzstein *et al.*, 1993).

El zanamivir contiene un grupo guanidino, y el oseltamivir un grupo amino, según se aprecia en sus fórmulas respectivas. Pues bien, determinaciones de la inhibición enzimática «han confirmado que los derivados 4-amino- y 4-guanidino- del Neu5Ac2en son inhibidores de alta afinidad de la actividad sialidásica del virus de la gripe. [...] Son inhibidores significativamente más potentes que cualquier otro descrito anteriormente, incluyendo el Neu5Ac2en y el análogo N-trifluoracetilado. [...] Los 4-amino- y 4-guanidin-Neu5Ac2en son menos activos frente a sialidasas de mamíferos, bacterianas y de virus para-influenza [...]. Son eficaces frente a virus influenza A y B» (von Itzstein *et al.*, 1993). Por todo ello, son muy útiles.

¿Por qué el zanamivir y el oseltamivir son inhibidores tan eficaces de la sialidasa de los virus de la gripe tipo A (incluida la gripe aviar) y tipo B?: Porque se unen al sitio activo de la enzima con más intensidad que lo hacen el ácido *N*-acetilneuramínico y otros análogos estructurales.

En efecto, de los datos anteriores puede deducirse que: a) El ácido siálico se une mediante sus grupos carboxilato y glicerol a algunos aminoácidos (de carga de signo contrario) del sitio activo de la enzima, aunque no llegue al fondo de la cavidad. b) El zanamivir lo hace igualmente, pero además refuerza esta unión efectuándola mediante el voluminoso grupo guanidino (que reemplaza al hidróxilo), dotado de carga positiva, que le permite enlazarse a los aminoácidos de carga negativa situados en lo más profundo de la oquedad del sitio activo (circunstancia que no ocurría con el propio producto). c) En el caso de la forma activa del oseltamivir, teniendo también la unión del grupo carboxilato como

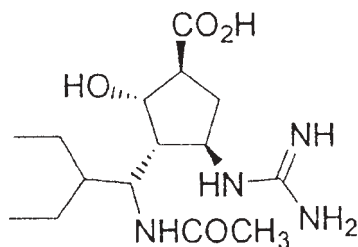
en los dos casos anteriores, el grupo hidrófobo que posee forma una bolsa hidrofóbica que contribuye a su unión con ciertas zonas del sitio activo (aunque no sean las del fondo) (Laver *et al.*, 1999). d) Quedando unidos al sitio activo de la sialidasa, lo hacen tanto el zanamivir como el oseltamivir con mayor intensidad que lo haría el propio producto de la reacción (el ácido *N*-acetilneuramínico); pero ello no quiere decir que lo hagan implicando exactamente a todos los mismos aminoácidos del sitio activo o de sus zonas contiguas.

Esto explicaría el hecho de que pueden presentarse fenómenos de resistencia a la acción de dichos dos agentes antivirales, que pueden ser comunes o diferentes para cada uno de ellos (véase sección 6.4).

### 6.3. Inhibidores de la neuraminidasa en estudio (pero no en uso) como potenciales fármacos antrigripales: Peramivir, dímeros del zanamivir, derivados del ácido benzóico, tioacetazona, derivados del ácido *N*-acetil-D-glucosaminurónico, sales minerales y orgánicas

— El compuesto denominado RWJ-270201 (BCX-1812) o **peramivir** (de BioCryst/Johnson & Jonson) viene siendo estudiado, desde aproximadamente 1987, con la misma finalidad que los precedentes. La FDA norteamericana aprobó, en diciembre de 2005, el comienzo por BioCryst de los ensayos clínicos en humanos, para su uso en la modalidad inyectable.

Su composición es la siguiente:



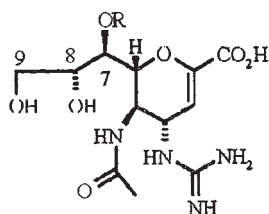
Peramivir



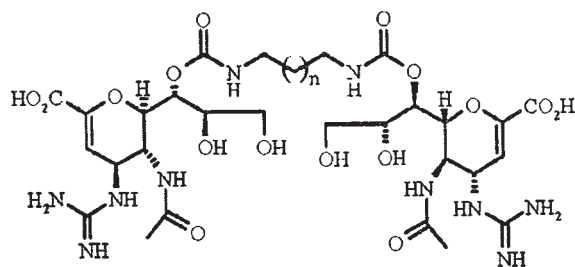
Puede apreciarse que comparte con el zanamivir la presencia en su molécula del grupo guanidino, y con el oseltamivir la cadena lateral lipófila, difiriendo de ambos por contener un ciclopentano en lugar de los anillos hexagonales de éstos.

— **Dímeros del zanamivir**, que varían entre sí por la índole o la longitud de la cadena (en algunos de ellos ésta es de grupos  $-\text{CH}_2-$ ), serían «potentes inhibidores, de acción prolongada, de la neuraminidasa de la influenza, incluida la influenza aviar H5N1», según una publicación del año 2005 (Macdonald *et al.*, 2005), de autores vinculados a las industrias GlaxoSmithKline/Biota.

Sus estructuras son las siguientes:



**1** R = H, Zanamivir



**3**  $n = 12$

**15**  $n = 11$

«El **dímero 3** —[en que el número de grupos  $-\text{CH}_2-$  de enlace es 12]— es 100 veces más potente que el zanamivir en un modelo de profilaxis *in vivo* en ratón» (Macdonald *et al.*, 2005); y también sería más prolongada su acción que la del zanamivir.

En otras estructuras relacionadas, las uniones contienen anillos ben-  
cénicos u otros componentes orgánicos.

— Un trabajo del año 1997, de autores vinculados a «BioCryst Pharmaceuticals», se refiere al diseño y síntesis de **derivados del ácido benzóico** como inhibidores de la neuraminidasa de virus de la gripe (Chand *et al.*, 1997). Aunque el compuesto número **5**, que es el ácido 4-(acetilamino)-3-guanidinobenzóico, parece ser que presenta actividad *in vivo*, «may not have properties suitable for *in vivo* efficacy» (Chand *et al.*, 1997).

Relacionada con esta publicación es otra, de 1995, en que se estudian con la misma finalidad otros derivados del ácido benzóico, indicando que alguno poseería «moderada actividad inhibidora de la neuraminidasa» (Jedrzejewski *et al.*, 1995).

No parece que haya habido, desde los años 1995 ó 1997, continuación de esta línea investigadora derivada del ácido benzóico.

— Tampoco ha tenido desarrollo otra aproximación a este asunto consistente en el intento de bloquear la acción de la neuraminidasa de influenza A por un mecanismo no competitivo, que ejercería la **tioacetazona** sobre el  $\text{Ca}^{2+}$  (necesario para mantener la enzima en la conformación activa) (Wu *et al.*, 1995). La tioacetazona es un tuberculostático, cuya composición es: tiosemicarbazona-4'-formilacetanilida.

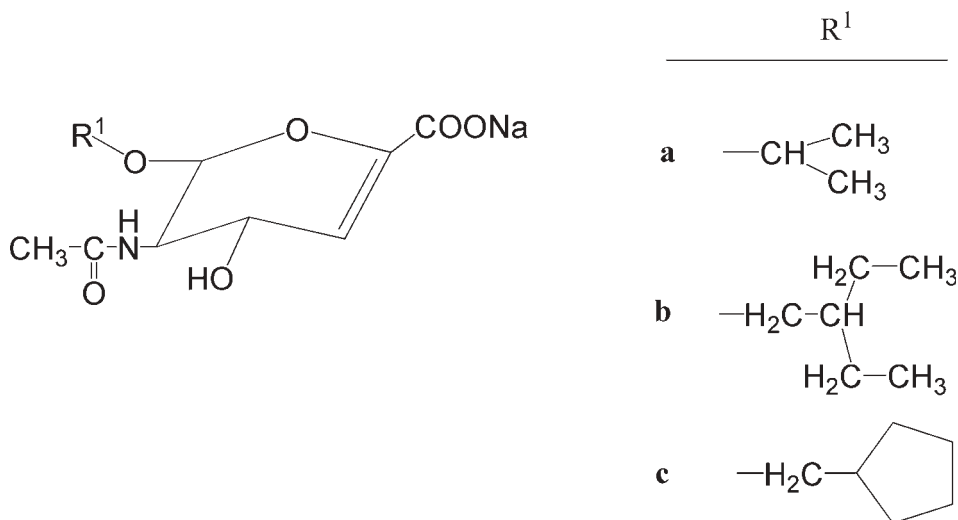
— En nuestro laboratorio se ensayaron algunas **sales minerales y orgánicas** como posibles inhibidores, según mecanismo diferente del típico de los análogos del producto, antes indicados. Un efecto inhibidor fuerte se consiguió (Cabezas, 1978), *in vitro*, con los siguientes compuestos:  $\text{Cl}_2\text{Hg}$ ,  $\text{SO}_4\text{Hg}$ ,  $(\text{NO}_3)_2\text{Hg}$ ,  $(\text{CH}_3\text{-COO})_2\text{Hg}$  y  $\text{IO}_4\text{K}$ . La toxicidad inherente al  $\text{Hg}^{2+}$  limitó la utilidad de estos trabajos. Con otras sales, el efecto inhibidor resultó ser muy escaso (Cabezas, 1978). Pudo deducirse también que algunos compuestos (de índole varia) que habían sido considerados como inhibidores de esta enzima por otros autores realmente no lo eran, sino que las interferencias cromáticas producidas por esas sustancias en la reacción del ácido tiobarbitúrico —empleada para la valoración del ácido siálico liberado— habían conducido a errores (Cabezas, 1978).

Por todo ello, se abandonó por nuestra parte esta faceta investigadora relacionada con tales inhibidores de la sialidasa del virus de la

gripe. Pero, futuros ensayos con otras sales, podrían ser tal vez interesantes.

— Muy recientemente, se ha propuesto una nueva serie de inhibidores de la mencionada sialidasa vírica, constituida por **derivados del ácido *N*-acetil-D-glucosaminurónico** (Mann *et al.*, 2006).

Las tres estructuras siguientes (a, b, y c) poseen poder inhibidor frente a las sialidasas N9 y N2 de virus de la gripe similar al del Neu5Ac2en, constituyendo, sobre todo, una nueva línea de interés muy prometedor:



#### 6.4. Eficacia del zanamivir y el oseltamivir, fenómeno de resistencia a los mismos por mutaciones víricas, y planes de coordinación para luchar contra riesgos futuros.

— Limitando el comentario sobre la **eficacia** de los dos fármacos de uso autorizado (zanamivir y oseltamivir) y al que es previsible no tarde mucho en serlo, el peramivir (dado el avanzado estado de sus ensayos y del conocimiento de los datos ya publicados acerca de él), pueden resumirse algunos aspectos relativos a los mismos del siguiente modo:

- «Los inhibidores de la neuraminidasa parece ser son eficaces en la **quimioprofilaxis** y podrían ser empleados en la protección de quienes no están en condiciones de recibir vacunas o no responden a ellas [...] debido [a la aparición] de virus antigénicamente nuevos» (Gubareva *et al.*, 2000). Además, su uso es compatible y complementario con el de las vacunas (Cabezas y Hannoun, 1990; Cabezas, 2004).
- La **posología y formas farmacéuticas** recomendadas de estos fármacos (que deben ser utilizados, o preventivamente, o cuanto antes, cuando ya se ha producido la infección, pero en todo caso dentro del plazo de unas 48 horas desde detectarse los síntomas de gripe) son, para los adultos (y con modificaciones para niños, etc.), aproximadamente, las siguientes:
  - Zanamivir («Relenza»):  
Por inhalación: 10 mg/día, 5 días.
  - Oseltamivir, fosfato («Tamiflu»):  
Por vía oral: 75 mg/2 veces/día, 5 días.
  - Peramivir:  
Por inyección, solamente 1-2 veces por semana.  
(Útil en profilaxis).
- Un derivado del ácido benzoico, el fármaco usado contra la gonorrea denominado **probenecid**, si es empleado simultáneamente con el oseltamivir, «duplica la máxima concentración de éste en sangre» (Butler, 2005); ahorrando, por tanto, el consumo del oseltamivir, de modo paralelo a como ocurrió con la penicilina en su época inicial de los años de la década de 1940.

— Como era previsible y fue advertido (von Itzstein *et al.*, 1993), se han detectado **cepas de H5N1 resistentes** a los inhibidores de la sialidasa, que han podido ser producidas como resultado de haberse empleado dosis o periodos de tiempo insuficientes en los tratamientos.

La mutación de histidina 273 por tirosina en la sialidasa hace resistente el virus frente al oseltamivir (Baum *et al.*, 2003; Le *et al.*, 2005).

También se han descrito otras mutaciones, como la que afecta a una cepa B (por arginina 152) o a una cepa A (por arginina 292) o a ambas cepas por sustitución de ácido glutámico 119 (Baum *et al.*, 2003). No obstante, esta última mutación, que afecta al zanamivir haciéndolo ineficaz, no impide que sigan siendo eficaces peramivir y oseltamivir-carboxilato (Baum *et al.*, 2003). Por otro lado, la resistencia a la rimantadina no influye en la actividad sialidásica de virus de la gripe tipo A (García-Sastre *et al.*, 1990).

— En lo que concierne a la mayor o menor **eficacia** de los tres agentes comentados, hay que advertir que cada uno de ellos requiere para su resultado más favorable unas vías de penetración y una forma farmacéutica distintas.

En 2001, un trabajo de Webster *et al.* (Govorkova *et al.*, 2001) relativo a la eficacia de peramivir, zanamivir y oseltamivir-carboxilato frente a virus de influenza aviar H5N1, H9N2 y otros subtipos, administrados todos estos agentes oralmente a ratones, mostró que el primero ejercía un efecto superior a cada uno de los otros dos. Pero, obsérvese que las vías recomendadas para su uso, son, respectivamente, por inyección, por inhalación y oralmente; y, parece ser, no fueron las utilizadas en el experimento.

— La aceptación de la necesidad de **coordinar esfuerzos** entre las distintas naciones en aras de la mayor eficacia en la lucha contra la temida posibilidad de una próxima pandemia que produciría el subtipo H5N1 del virus de la gripe o algún otro similar ha sido la consecuencia de varias importantes reuniones internacionales celebradas con esta finalidad. Incluso se ha previsto la disponibilidad inmediata de los fármacos antivirales allí donde fueran más necesarios, para atajar de raíz tal riesgo («apagar el fuego en el sitio de origen»).

La Administración Bush había ya propuesto la concesión de 7,1 billones de dólares para estos fines, en noviembre de 2005 (Kaiser, 2005).

Análogamente, la Unión Europea ha invertido, desde el año 2000 (hasta marzo de 2006), unos 40 millones de euros en sistemas de detección precoz y proyectos de investigación sobre vacunas y agentes antivirales relacionados con la influenza aviar.

Cabe preguntarse: ¿Serán eficaces estos planes para evitar/detener/erradicar una eventual pandemia?

Como resumen acerca de esta cuestión, puede decirse que existen opiniones optimistas, frente a otras que no lo son tanto. Información correspondiente a ellas puede obtenerse en publicaciones, fácilmente accesibles, como las de las referencias siguientes (cuyo título ya anticipa en algunos casos el punto de vista de los autores): Cabezas, 2004; WHO, 2005; Gubareva *et al.*, 2000; Moscona, 2005; Jefferson, 2006; Nicholson *et al.*, 2000; Tumpey *et al.*, 2002; Abbot, 2005; Colmes *et al.*, 2005; Tsang *et al.*, 2005; Gibas y Soares, 2005; Normile, 2005 y 2006; Editorial, 2005; Butler, 2006; Hayeden, 2006; Soares, 2005; Kaiser, 2004; Editorial, 2006; Enserink, 2006; Chretien *et al.*, 2006).

Una publicación, de enero de 2006, hace la siguiente interpretación del resultado de su amplio análisis: «El uso de amantadina y rimantadina debe ser desaprobado. A causa de su baja eficacia, los inhibidores de la neuraminidasa no deberían usarse para el control de la gripe estacional y deberían ser empleados solamente en epidemias graves o pandemia junto a otras medidas de salud pública» (Jefferson, 2006).

Por otro lado, ¿convendrá confiar a los hospitales única o principalmente, o a facultativos particulares, el manejo de los fármacos antigripales en caso de pandemia?: Según Tsang y col. (Tsang *et al.*, 2005)—de Universidades de Hong Kong, Singapur, Malasia y Corea del Sur—, «parece conveniente que sea personal sanitario del vecindario o farmacéuticos, mejor que trabajadores sanitarios de hospitales, quienes manejen tales procedimientos». Además, estos autores (Tsang *et al.*, 2005) consideran que «la ética de mantener patentes de medicamentos en una catástrofe mundial es cuestionable».

En Australia, otro experto, Laver (Laver, 2005), considera errónea la estrategia gubernamental de almacenar oseltamivir para proteger una parte de la población, y estima más eficiente tener este fármaco «disponible en las farmacias locales, en coordinación con un test de diagnóstico de la gripe, rápido, sensible y seguro».

En relación con este asunto, ¿qué criterios se consideran adecuados en América y en la Vieja Europa?...

— Otro aspecto es el de la previsión de la eventual transmisión de la gripe H5N1 de seres humanos a humanos, analizándola mediante **modelos matemáticos** que pueden simular las circunstancias, teniendo en cuenta la disponibilidad de fármacos antivirales, etc. Varios trabajos relativos a este tema han sido publicados en el año 2005 (Longini *et al.*, 2005, Ferguson *et al.*, 2005).

— Asimismo, es sabido que la **red de vigilancia internacional** constituye un valiosísimo sistema de alerta. Últimamente se confirmaba que «una buena vigilancia es pieza clave para responder a una pandemia por influenza aviar», y se proponía la creación de «una nueva red de laboratorios “modelled on existing military facilities”» (Chretien y Blazes, 2006).

## 7. OTRAS ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS FRENTE AL VIRUS DE LA GRIPE (COMPROBADAS O EN FASE DE DESARROLLO)<sup>1</sup>

### 7.1. Arbidol: Fármaco antigripal, usado en Rusia y China

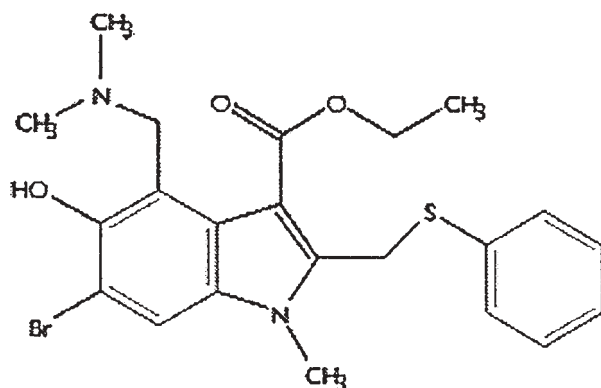
A diferencia de los inhibidores de la neuraminidasa antes analizados, que actúan en la propuesta fase 3.<sup>a</sup> del ciclo biológico del virus de la gripe (sección 6.1), el arbidol interviene inhibiendo la fase 1.<sup>a</sup> de dicho ciclo, impidiendo la fusión del virus (en que participa su hemaglutinina) con la célula hospedadora (Cabezas y Hannoun, 1990; Cabezas, 2005).

Escasea información acerca de este antiviral, a pesar de que ya en 1990 se disponía de datos acerca del mismo.

¿Cuál es su composición?: Es un derivado indólico. Es el clorhidrato del eter etílico del 6-bromo-5-hidroxi-1-metil-4-dimetilamino -metil-2-feniltiometilindol-3-ácido carboxílico:

---

<sup>1</sup> Tratar de incluir en las páginas siguientes el contenido detallado correspondiente a este enunciado desbordaría los límites previstos para el presente trabajo. Por ello, se intentará indicar únicamente los aspectos esenciales de algunas de estas prometedoras, pero aún no consolidadas, estrategias, en pleno desarrollo actualmente. También se incorporará bibliografía que puede considerarse como útil.



Se estima que, además de la actividad inhibidora de la mencionada fusión, podría ejercer efectos no específicos inmunoestimuladores, induciendo la actividad del interferón, estimulando respuestas inmunitarias así como la función fagocitaria de los macrófagos, favoreciendo la resistencia de los organismos frente a la infección vírica.

Desde hace ya varios años viene usándose en Rusia, con la doble finalidad profiláctica y terapéutica, en forma de cápsulas; y también en China.

Una publicación de 2005, que se refiere a la «sensibilidad de virus de influenza A/H5 aislados de aves silvestres del territorio de Rusia al arbidol» (Fediakina *et al.*, 2005), señala que dicho agente ejerce un efecto inhibitor selectivo en la reproducción de estos virus en los cultivos celulares.

Otro trabajo (Leneva *et al.*, 2005) da a conocer que «tiene un amplio espectro de actividad antivírica e inhibe la reproducción: de varios subtipos antigénicos de virus de la influenza humana resistentes a la rimantadina, de virus aviáres H5N1 y H9N2, y de virus de influenza B y C».

## 7.2. Fludase<sup>®</sup>

La compañía NexBio (de San Diego) está estudiando el producto denominado Fludase<sup>®</sup> con un enfoque distinto de los hasta ahora co-



mentados. «*Fludase*® is a recombinant fusion protein cost-effectively produced in *E. coli* through a fermentation process [...] *Fludase* acts as an enzyme, chopping off flu viral receptors, disabling them».

«Una vez inhalado, este fármaco recubre las células del tracto respiratorio, dirigiéndose precisamente a los mismos receptores utilizados por la hemaglutinina vírica. [...] El virus no puede entrar en las células. Se asienta allí hasta que el sistema inmune lo elimina». Actuaría el agente, por tanto, en la fase 1.<sup>a</sup> del ciclo vírico, bloqueándola. Según información de esta empresa, cerrando la puerta, en vez de dirigirse al intruso, «the company hopes to create a drug that is equally effective on all flu viruses and offers them no way to develop resistance». Considerado como un producto no inmunógeno, se aplicaría por inhalación. En enero de 2006 había superado los ensayos preclínicos.

### 7.3. Glicoproteína 340, otros glicoconjugados, y amantadina y rimantadina

— La **glicoproteína 340**, que puede aislarse del pulmón y la saliva, ejerce poder inhibidor sobre virus A de la gripe, por la capacidad de unirse sus ácidos siálicos (preferentemente los de enlaces  $\alpha$ -2,3) a la hemaglutinina vírica (Hartshorn *et al.*, 2006). Aparecen diferencias entre unos individuos y otros en lo relativo al contenido de dicha glicoproteína, motivo adicional que podría tal vez explicar las variaciones interindividuales apreciadas en cuanto a defensas frente a la gripe.

Se interpreta que su mecanismo de acción sería el de actuar como las mucinas que proveen de ligandos conteniendo ácidos siálicos que se unen a la hemaglutinina vírica (White *et al.*, 2005).

— ¿Podría tener relación esta **glicoproteína** con otras que son **resistentes a la degradación por la neuraminidasa** de virus de la gripe tipo A y se hallan en sueros de diferentes especies animales? (Suzuki *et al.*, 1994): Quizá.

— Pero no solamente sialoglicoproteínas como las precedentes podrían unirse a la hemaglutinina de virus de la gripe, sino que compuestos como los **derivados sintéticos de una sialilfosfatidiletanolamina** podrían inhibir la infección del virus de la gripe A en cultivos celulares;

por lo que podrían ser potenciales agentes contra esta infección (Guo *et al.*, 1998).

— Independientemente de lo anterior, ¿podría el **alga marina roja** *Ceramium rubrum*, de la costa búlgara del Mar Negro, reducir la producción de la hemaglutinina de los virus de la gripe tipos A y B, inhibiendo su replicación, como se ha sugerido en 2004? (Serkedjieva, 2004). Aunque no se indica en la publicación la composición del factor causante del proceso, cabe sospechar que se trate de sustancias de tipo glucídico.

— Esencialmente por el mecanismo consistente en bloquear etapas de la considerada como fase 1.<sup>a</sup> del ciclo vírico actúan las aminas **aman-tadina** y **rimantadina**.

No se indican aquí sus datos, por haberse ya detallado (Cabezas y Hannoun, 1990; Cabezas, 2004) sus características de composición química, mecanismo de acción (principalmente bloqueando el acceso de cationes que en condiciones normales realiza la proteína M2), y sus desventajas (actuar sólo sobre los virus de la gripe tipo A, producir náuseas y malestar en las personas, y originar fácilmente su uso cepas víricas resistentes). Por esos inconvenientes, su uso está oficialmente desaconsejado; a pesar de los cual, en países del lejano Oriente parece ser se siguen empleando, especialmente para luchar contra epizootias que sufren las aves de corral.

#### 7.4. ARN interferentes, ribavirina, ADN antisentido, y moléculas que bloquean las proteínas NS<sub>2</sub> o NS<sub>1</sub>

Finalmente, los siguientes compuestos son moléculas de índole varia, pero todas ellas relacionadas en su mecanismo de acción con alguna de las etapas de la considerada como fase 2.<sup>a</sup> del ciclo vírico (sección 6.1).

— Los **ARN interferentes** (o pequeñas moléculas de ARN interferente (= *Small interfering RNAs*, *siRNAs*) son moléculas de ARN, de doble banda, que inhiben la expresión génica de secuencias específicas del ARN homólogo, por un proceso de «silencio del gen» (*post-transcriptional gene silencing*), también denominado interferencia del ARN (= *RNA interference*, *RNAi*). Se espera mucho de esta nueva línea de

investigación, a juzgar por lo expresado en publicaciones prestigiosas (Bennink y Palmore, 2004; Tompkins *et al.*, 2004; Hannon, 2002; Sullenger y Gilboa, 2002; Gitlin *et al.*, 2002; Tompkins *et al.*, 2004; Dorset, 2005). En una de ellas (Tompkins *et al.*, 2004) se destaca que «la interferencia por ARN es un medio eficaz de suprimir la replicación del virus *in vitro*. Se demuestra que el tratamiento con pequeños ARN interferentes (siRNAs), específicos para regiones altamente conservadas de nucleoproteínas o de la polimerasa ácida, inhibe la replicación del virus de la gripe tipo A *in vivo*». También inhibe la replicación *in vivo* de otros virus. (Datos adicionales pueden fácilmente consultarse en las publicaciones de las referencias siguientes: Bennink y Palmore, 2004; Tompkins *et al.*, 2004; Hannon, 2002; Sullenger y Gilboa, 2002; Gitlin *et al.*, 2002; Tompkins *et al.*, 2004; Dorset, 2005.)

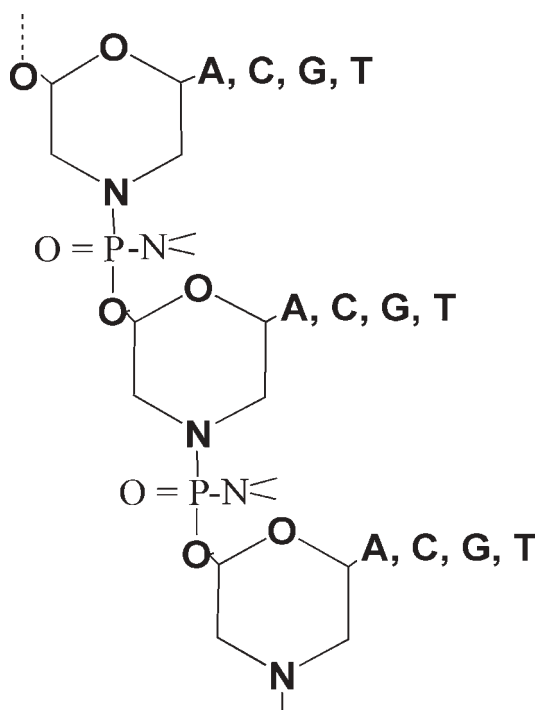
— La **ribavirina** (registrada comercialmente como «virazol») es un nucleósido: carboxamida del ribofuranosil-tiazol (cuya estructura se muestra en la publicación de Cabezas y Hannoun, 1990). Al bloquear la biosíntesis del guanosín-5'-monofosfato, inhibe la biosíntesis del ARN, y bloquea el ciclo vírico. Actúa no sólo sobre los virus de la gripe tipos A y B sino sobre otros; pero sus efectos secundarios desfavorables han hecho que, ya desde hace algunos años, su uso esté prohibido en algunos países y desaconsejado en otros muchos.

— Los **ADN antisentido** (= *Antisense DNA*) son subunidades naturales y sintéticas de ADN, unidas entre sí por un esqueleto cargado negativamente, que se enlazan al ARN del virus determinante de los mecanismos biosintéticos de éste, bloqueándolos:

Se estima que poseen propiedades interesantes, por su estabilidad y especificidad; aunque aún se encuentre su eventual futuro uso terapéutico un tanto lejano.

— En relación con la **cascada de señales relativas a la replicación del virus de la gripe**, existe poca información. Una inhibición en la misma ocasiona la retención del complejo de las ribonucleoproteínas, dañando la función de la proteína no estructural NS<sub>2</sub>, y bloqueando la propia producción del virus.

También parece ser ésta otra interesante línea de investigación (Plesehka *et al.*, 2001), al igual que cualquier otra relacionada con el bloqueo de la biosíntesis de la proteína NS<sub>1</sub> (Kaiser, 2004). Estos estudios



aún se hallan en situaciones que necesitan un desarrollo ulterior. Un mejor conocimiento de la arquitectura molecular de los complejos de las ribonucleoproteínas del virus de la influenza A favorecerá el avance de estas investigaciones (Noda *et al.*, 2006).

— Independientemente de lo antes indicado acerca de fármacos y potenciales agentes antigripales, es sabido que las **vacunas** (Cabezas y Hannoun, 1990; Cabezas, 2004) constituyen un valiosísimo arsenal que se halla actualmente también en plena expansión, al tratar de incorporar aquellas obtenidas por genética inversa. Pero este contenido corresponde a otros capítulos.

## AGRADECIMIENTOS

A todos los miembros tanto del equipo español del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Salamanca,

Facultad de Biología, como a los pertenecientes a la *Unité d'Écologie Virale* del Instituto Pasteur de París (Profesor C. Hannoun), cuyos nombres se indican en las referencias bibliográficas como coautores, y de modo especial a los Doctores M. Cabezas (†), Ángel Reglero, P. Calvo, E. Villar, A. García-Sastre, C. Sánchez-Bernal e I. Muñoz-Barroso, que colaboraron eficazmente sobre todo en la parte experimental de los trabajos aquí mencionados.

A la Fundación Juan March, Instituto Pasteur de París, GEIG (*Groupe d'Étude et d'Information sur la Grippe*), CAICYT, Gobiernos Español y Francés (Acciones Integradas), así como a la Junta de Castilla y León, por su ayuda económica a lo largo de los 20 años empleados en la realización de todos estos trabajos.

Al Académico Profesor A. Domínguez-Gil Hurlé, por haber facilitado datos acerca de algunos posibles agentes antivirales actualmente en estudios preclínicos.

Al personal de la Real Academia Nacional de Farmacia, por la transcripción del texto.

A mi esposa, por su reiterada generosidad.

## BIBLIOGRAFÍA

- ABBOT, A. (2005): What's in the medicine cabinet? *Nature* **435**: 407-409.
- BAUM, E. Z.; WAGAMAN, P. C. [...]; BUCHER, D., BUSH, K. (2003): A point mutation in influenza B neuraminidase confers resistance to peramivir and loss of slow binding. *Antiviral Res.* **59**: 13-22.
- BENNINK, J. R., PALMORE, T. N. (2004): The promise of siRNAs for the treatment of influenza. *Trends. Mol. Med.* **10**: 571-574.
- BLIX, C.; GOTTSCHALK, A., KLENK, E. (1957): Proposed nomenclature in the field of neuraminic and sialic acids. *Nature* **179**: 1088.
- BUTLER, D. (2005): Wartime tactic doubles power of scarce bird-flu drug. *Nature* **438**: 6.
- (2006): Will H5N1 flu virus acquire the ability to spread between people? *Nature* **439**: 124-126.
- CABEZAS, J. A. (1961): Acides Sialiques: Leur Signification Biochimique. *Le Pharm. Biol.* **2**: 9-19.
- (1968): Estudio de los ácidos siálicos en diversos materiales biológicos (*Discurso de incorporación como Académico Correspondiente de la Real Acad. Farm.*). *An. Real Acad. Farm.* **24**: 154-172.

- (1978): Determination of the inhibitory effect of several compounds of neuraminidases from virus influenza, *V. cholerae* and *Cl. perfringens*. *Int. J. Biochem.* **9**: 47-49.
- (1990): Datos sobre las pandemias de gripe de 1889-90 y 1918-19 en Madrid y Salamanca, y estudios sobre la sialidasa de los virus C. *Discurso de recepción como Académico de Número en la Real Academia de Farmacia*. Madrid, 1-93.
- (1991a): Some questions and suggestions on the type references of the official nomenclature (IUB) for sialidase(s) and endosialidase. *Biochem. J.* **278**: 311-312.
- (1991b): Études sur la sialidase et l'estérase des virus de la grippe. *Ann. pharmaceutiques françaises* **49**: 55-66. (Discurso de incorporación como Académico Correspondiente en la *Académie Nationale de Pharmacie*, París, 5 de octubre de 1988).
- (1993): Glicobiología: Antecedentes y evolución de su contenido. *Discurso de apertura del curso 1993-94*, Universidad de Salamanca, 1-102.
- (1995a): Glicoconjugados: Algunos aspectos bioquímicos y farmacéuticos. *An. Real Acad. Farm.* **61**: 177-188.
- (1995b): Glicoconjugados: Su participación en funciones de los seres vivos. *Mundo Científico* **159**: 634-659.
- (2000): Glicociencia: Glicobiología, Glicopatología, Glicoterapéutica, Glico(bio)-tecnología, *Instituto de España*, Madrid, 1-54.
- (2004): Datos actuales sobre virus de la gripe de patos salvajes y pollos, y virus de la gripe tipo C. Agentes antigripales. *Monografía conjunta de las Reales Academias Nacionales de Medicina y Farmacia* (31-III-2004), titulada: Síndrome agudo respiratorio y gripe aviar.
- (2005): Nuevos datos acerca del virus causante de la pandemia de gripe de 1918-19 y su relación con los de la gripe aviar. Datos recientes relativos a éstos. *Anal. Real Acad. Nac. Farm.* **71**: 83-110.
- (2006): Gripe aviar: Situación actual. *Anal. Real Acad. Nac. Farm.* **72**: 301-315.
- CABEZAS, J. A.; CABEZAS, M.; CALVO, P.; MARTÍN, J.; PÉREZ, N.; HUESO, P.; RODRIGO, M., REGLERO, A. (1982b): Neuraminidasa de virus de la gripe. *Rev. Esp. Fisiol.* **38** (supl.): 81-86.
- CABEZAS, J. A.; CALVO, P.; EID, P.; MARTÍN, J.; PÉREZ, N.; REGLERO, A.; RODRIGO, M., HANNOUN, C. (1981): Studies of neuraminidase from influenza virus A (H3N2) obtained by two procedures. *Int. J. Biochem* **14**: 311-319.
- CABEZAS, J. A.; CALVO, P.; EID, P.; MARTÍN, J.; PÉREZ, N.; REGLERO, A., HANNOUN, C. (1980): Neuraminidase from influenza virus A (H3N2). *Biochim. Biophys. Acta* **616**: 225-238.
- CABEZAS, J. A.; CALVO, P.; LLANILLO, M.; RODRÍGUEZ, J. A.; HUESO, P.; SÁNCHEZ-BERNAL, C., HANNOUN, C. (1985): Sialidases from Three Different Influenza Virus Strains (H1N1, H2N2 and H3N2): Characterization and Kinetics. *Glycoconj. J.* **2**: 387-399.
- CABEZAS, J. A.; CALVO, P.; MARTÍN, J.; PÉREZ, N.; REGLERO, A.; RODRIGO, M., HANNOUN, C. (1982a): Characteristics of a neuraminidase released both by bromelain

- and *N*-laurylsarcosine from influenza virus A (H3N2). *Glycoconjugates, Proc. VI Int. Symp. Glycoconj.*, Tokyo, Japan, 209-210.
- CABEZAS, J. A., HANNOUN, C. (1990): La gripe y sus virus. *Inv. Ciencia*, **159**: 62-69.
- CABEZAS, J. A.; MILICUA, M.; SÁNCHEZ-BERNAL, C.; VILLAR, E.; PÉREZ, N., HANNOUN, C. (1989): Kinetic studies on the sialidase of three influenza B and three influenza A virus strains. *Glycoconj. J.* **6**: 219-227.
- CABEZAS, J. A.; PÉREZ, N.; LLANILLO, M.; REGLERO, A., CALVO, P. (1984): Sialidase Assay by Luminiscence in the Low Picomole-Range of Sialic Acid. Its application to the Measurement of this Activity in Influenza Virus. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **365**: 415-418.
- CABEZAS, J. A.; REGLERO, A., CALVO, P. (1983a): Glycosidases. (Fucosidases, galactosidases, glucosidases, hexosaminidases and glucuronidase from some molluscs and vertebrates, and neuraminidase from virus). *Int. Biochem.* **15**: 243-259.
- CABEZAS, J. A.; REGLERO, A., HANNOUN, C. (1983b): A Fluorometric Procedure for Measuring the Neuraminidase Activity: Its Application to the Determination of This Activity in Influenza and Parainfluenza Viruses. *Anal. Biochem.* **131**: 121-126.
- CABEZAS, J. A.; VILLAR, E.; GARCÍA-SASTRE, A.; MANUGUERRA, J.-C., HANNOUN, C. (1991): New data on the influenza virus type C confirm its peculiarities as a new genus. *Intervirology* **32**: 325-326.
- (1993): Sialidase, *O*-acetylsterase, and genetic manipulation in influenza viruses. *Trends in Comparat. Biochem. Physiol.* **1**: 779-800.
- CHAND, P.; YARLAGA, S. B. [...]; LAVER, W. G., WALS, G. M. (1997): Design and Synthesis of Benzoic Acids Derivatives as Influenza Neuraminidase Inhibitors Using Structure-Based Drug Design. *J. Med. Chem.* **40**: 1030-4052.
- CHONG, A. K. J.; PEGG, M. S.; TAYLOR, N. R., VON ITZSTEIN, M. (1992): Evidence for a sialosyl cation transition-state complex in the reaction of sialidase from influenza virus. *Eur. J. Biochem.* **207**: 335-343.
- CHRETIEN, J.-P., BLAZES, D. L. (2006): Global network could avert pandemics. *Nature* **440**: 25-26.
- CLAAS, E. C.; OSTERHAUS, A. D. [...]; SHORTRIDGE, K. F., WEBSTER, R. G. (1998): Human influenza A H5N1 virus related to a highly pathogenic avian influenza virus. *The Lancet* **351**: 472-477.
- COLMAN, P. M.; VARGHESE, J. N., LAVER, W. G. (1983): Structure of the catalytic and antigenic sites in influenza virus neuraminidase. *Nature* **303**: 41-44.
- DORSET, Y., TASCHL. (2005): siRNAs: Applications in functional genomics and potential as therapeutics. *Nature (Rev. Drug Discovery)* **3**: 318-329.
- EDITORIAL (2006): Global avian influenza controls must be scaled up now. *The Lancet* **367**: 184.
- (2005): Fear of avian influenza is a double-edged sword. *The Lancet* **366**: 1751.
- ENSERINK, M. (2006): New Study Casts Doubts on Plans for Pandemic Containment. *Science* **311**: 1084.

- FAILLARD, H. (1989): The early history of sialic acids. *Trends Biochem. Sci.* **14**: 237-241.
- FEDIKINA I. T.; LENEVA, I. A.; IAMNIKIVA, S. S.; LIVOV, D. K.; GLUSHKOV, R. G., SHUSTER, A. M. (2005): Sensitivity of influenza A/H5 viruses isolated from wild birds on the territory of Russia to arbidol in the cultured MDCK cells. *Vopr. Virusol.* **50**: 32-35.
- FERGUSON, N. M.; CUMMING, D. A.; CONCHEMEZ, S. [...], BURKE, D. (2005): Strategies for containing an emerging influenza pandemic in Southeast Asia. *Nature* **437**: 209-214.
- FIZON, B.: Contribution à l'étude de la circulation du virus de la grippe dans les populations animales. Thèse pour le Diplôme d'Etat de Docteur Vétérinaire (1988). Nantes (France).
- FIZON, B.; HANNOUN, C.; GARCÍA-SASTRE, A.; VILLAR, E., CABEZAS, J. A. (1989): Comparison of biological and physical properties of human and animal A (H1N1) influenza viruses. *Res. Virol.* **140**: 395-404.
- GABRIEL, G.; DAUBER, B. [...]; KLENK, H.-D., STECH, J. (2005): The viral polymerase mediates adaptation of an avian influenza virus to a mammalian host. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102**: 18590-18595.
- GARCÍA-SASTRE, A.; VILLAR, E.; HANNOUN, C., CABEZAS, J. A. (1990): Sialidase Activity in Rimantadine-Resistant and Sensitive Influenza A Viruses. *Enzyme* **43**: 207-211.
- GARCÍA-SASTRE, A.; VILLAR, E.; MANUGUERRA, J.-C.; HANNOUN, C., CABEZAS, J. A. (1991): Activity of influenza C virus *O*-acetyltransferase with *O*-acetyl-containing compounds. *Biochem. J.* **273**: 435-441.
- GEISS, G. V. [...]; TAUBENBERGER, J. K. [...]; PALESE, P. [...], GARCÍA-SASTRE, A. (2002): Cellular transcriptional profiling in influenza A virus-infected lung epithelial cells: The role of nonstructural NS1 protein in the evasion of the host innate defense and its potential contribution to pandemic influenza. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**: 10736-10711.
- GIBBS, B. W., SOARES, C. (2005): Preparing for a Pandemic. *Scient. Am.* Nov.: 23-31.
- GITLIN, L.; KARELSKY, S., ANDINO, R. (2002): Short interfering RNA confers intracellular antiviral immunity in human cells. *Nature* **418**: 430-434.
- GLASER, L. [...]; PALESE, P.; GARCÍA-SASTRE, A., TEWARI, D. (2006): Sequence analysis and receptor of the hemagglutinin of a recent influenza H2N2 virus isolated from chicken in North America. *Glycoconj. J.* **23**: 93-99.
- GOTO, H., KAWAOKA, Y. (1998): A novel mechanism for the acquisition of virulence by a human influenza A virus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**: 10224-10228.
- GOTTSCHALCK, A. (1960): The Chemistry and Biology of Sialic Acids and Related Substances. *Cambridge Univ. Press*, Cambridge (UK).
- GOVORKOVA, E. A.; LENEVA, I. A.; GOLONBEVA, J. G.; BUSH, K., WEBSTER, R. G. (2001): Comparison of efficacies of RWJ-270201 [=peramivir], zanamivir, and oseltamivir against H5N1, H9N2 and other avian influenza viruses. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**: 3723-2732.



- GUBAREVA, L. V.; KAISER, L., HAYDEN, F. K. (2000): Influenza virus neuraminidase inhibitors. *The Lancet* **353**: 827-835.
- GUO, C.-T.; WONG, C.-H. [...]; SUZUKI, T., SUZUKI, Y. (1998): Synthetic sialylphosphatidylethanolamine derivatives bind to human influenza A viruses and inhibit viral infection. *Glycoconj. J.* **15**: 1009-1108.
- HANNON, G. J. (2002): RNA interference. *Nature* **418**: 244-250.
- HARTSHORN, K. L.; LIGTENBERG, A.; WHITE, M. R., VAN EYK, M. *et al.* (2006): Salivary agglutinin and lung scavenger receptor cysteine-rich glycoprotein 340 have broad anti-influenza activities and interactions with surfactant protein D that vary according to donor source and sialylation. *Biochem. J.* **393**: 545-553.
- HATTA, M.; GAO, P.; HALFMANN, P., KAWAOKA, Y. (2001): Molecular Basis for High Virulence of Hong Kong H5N1 Influenza A Viruses. *Science* **293**: 1840-1842.
- HAYDEN, F. G. (2006): Antiviral Resistance in Influenza Viruses—Implications for management and Pandemic Response. *N. Engl. J. Med.* **354**: 785-788.
- HERRLER, G.; DÜRKOP, I.; BECHT, H., KLENK, H.-D. (1988): The glycoprotein of influenza C virus is the haemagglutinin, esterase and fusion factor. *J. Gen. Virol.* **69**: 839-846.
- HERRLER, G.; MÜLTHAUP, B. K., KLENK, H.-D. (1988): Serine 71 of the glycoprotein HEF is located at the active site of acetylsterase of influenza C virus. *Arch. Virol.* **102**: 269-274.
- HOLMES, E. C.; TAUBENBERGER, J. K., GRENFELL, B. T. (2005): Heading Off an Influenza Pandemic. *Science* **309**: 989.
- INTERNATIONAL UNION OF BIOCHEMISTRY (1961, 1964, 1965, 1972, 1984, 1992): *Enzyme Nomenclature* (Elsevier/Pergamon), EC 3.2.1.18 (y otras enzimas).
- JEDRZEJAS, M. J. [...]; LAVER, W. G.; AIR, G. M., LWO, M. (1995): Structures of Aromatic Inhibitors of Influenza Virus Neuraminidase. *Biochemistry* **34**: 3144-3151.
- JEFFERSON, T. (2006): Antivirals for influenza in healthy adults: systematic review. *The Lancet* **367**: 303- 313.
- KAISER, J. (2004): Facing Down Pandemic Flu, the World's Defenses Are Weak. *Science* **36**: 394-397.
- (2005): Pandemic or not, Experts Welcome Bush Flu Plan. *Science* **310**: 952-953.
- KENDAL, A. P. (1975): A comparison of «Influenza C» with prototype myxoviruses: Receptor-Destroying activity (neuraminidase and structural polypeptides). *Virology*, **65**: 87-99.
- KENDAL, A. P.; APOSTOLOV, K., BELYAVIN, G. (1969): The effect of protease treatment on the morphology of influenza A, B and C viruses. *J. Gen. Virol.*, **5**: 141-143.
- KIM, C. U.; LEW, W., WILLIAMS, M. A. *et al.* (1997): Influenza neuraminidase inhibitors possessing a novel hydrophobic interaction in the enzyme active site: design, synthesis, and structural analysis of carbocyclic sialic acid analogues with potent anti-influenza activity. *J. Am. Chem. Soc.* **119**: 681-690.
- KOGURE, T.; SUZUKI, T. [...]; KAWAOKA, Y., SUZUKI, Y. (2006): Human trachea primary epithelial cells express both sialy-2-3-Gal receptor for human parainfluenza virus

- type 1 and avian influenza viruses and sialyl-2-6-Gal receptor for human influenza viruses. *Glycoconj. J.* **23**: 101-106.
- LAU, L.-T.; BANK, J. [...]; XING, J., YU, A. C. (2003): Nucleic acid sequence-based amplification methods to detect avian influenza virus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **313**: 336-342.
- LAVER, G. (2005): Influenza drug could abort pandemic. *Nature* **434**: 821.
- LAVER, G., GARMAN, E. (2001): The Origin and Control of Pandemic Influenza. *Science* **293**: 1776-1777.
- LAVER, W. G.; BISCHOFBERGER, N., WEBSTER, R. G. (1999): Disarming Flu Viruses. *Scient. Am.* **280**: 56-65.
- LE, G. M.; KISO, M. [...]; SUZUKI, Y., KAWAOKA, Y. (2005): Isolation of drug-resistant H5N1 virus. *Nature* **437**: 1108.
- LENEVA, I. A.; FEDIAKINA, I. T.; GUSKOVA, T. A., GLUSHKOV, R. G. (2005): Sensitivity of various influenza virus strains to arbidol. Influence of arbidol combination with different antiviral drug on reproduction of influenza virus A. *Ter. Arkh.* **77**: 84-88.
- LI, K. S.; GUAN, J. [...]; WEBSTER, R. G., PEIRIS, J. S. M. (2004): Genesis of highly pathogenic and potentially pandemic H5N1 influenza virus in eastern Asia. *Nature* **430**: 209-212.
- LIU, J.; XIAO, H. [...]; WANG, J., GAO, G. F. (2005): Highly Pathogenic H5N1 Influenza Virus Infection in Migratory Birds. *Science* **309**: 1206.
- LONGINI, J. M. [...]; UNGCHUSAK, K.; CUMMINGS, D. A., HALLORAN, M. F. (2005): Containing Pandemic Influenza at the source. *Science* **309**: 1083-1087.
- MACDONALD, S. D. F.; CAMERON, R. [...]; WU, W.-Y., TUCKER, S. P. (2005): Dimeric Zanamivir Conjugates with Various Linking Groups Are Potent, Long-Lasting Inhibitors of Influenza Neuraminidase Including H5N1 Avian Influenza. *J. Med. Chem.* **48**: 2964-2971.
- MANN, M. C.; ISLAM, T.; DYASON, J. C.; FLORIO, P.; TROWER, C. J.; THOMSON, R. J., VON ITZSTEIN, M. (2006): Unsaturated *N*-acetyl-*D*-glucosaminuronic acid glycosides as inhibitors of influenza virus sialidase. *Glycoconj. J.* **23**: 127-133.
- MANUGUERRA, J.-C.; HANNOUN, C.; SIMÓN, F.; VILLAR, E., CABEZAS, J. A. (1993): Natural infection of dogs by influenza C virus: a serological survey in Spain. *Microbiologica* **16**: 367-371.
- MANUGUERRA, J.-C.; HANNOUN, C.; SÁENZ, M. C.; VILLAR, E., CABEZAS, J. A. (1994): Sero-epidemiological survey of influenza C virus infection in Spain. *Eur. J. Epidemiol.* **10**: 91-94.
- MATROSOVICH, M.; SUZUKI, T. [...]; WEBSTER, R. G., KLENK, H.-D. (2006): Gangliosides are not essential for influenza virus entry into cell. *Glycoconj. J.* **23**: 107-113.
- MEINDL, P.; BODO, G.; PALESE, P.; SCHULMAN, J., TUPPY, H. (1974): Inhibition of neuraminidase activity by derivatives of 2-deoxy-2,3-dehydro-*N*-acetylneuraminic acid. *Virology* **58**: 457-463.
- MOSCONA, A. (2005): Neuraminidase Inhibitors for Influenza. *N. Engl. J. Med.* **353**: 1363-1373.

- MUÑOZ-BARROSO, I.; GARCÍA-SASTRE, A.; MANUGUERRA, J.-C.; HANNOUN, C., CABEZAS, J. A. (1992): Increased influenza A virus sialidase activity with *N*-acetyl-9-*O*-acetylneuraminic acid-containing substrates resulting from influenza C virus *O*-acetylsterase action. *Virus Res.* **25**: 145-143.
- NEROME, K.; ISHIDA, M., NAKAYAMA, M. (1976): Absence of neuraminidase from influenza C virus. *Arch. Virol.* **50**: 241-244.
- NICHOLSON, K. G.; AOKI, F. Y.; OSTERHAUS, A. D. [...], WARD, P. (2000): Efficacy and safety of oseltamivir in treatment of acute influenza: a randomised controlled trial. *The Lancet* **355**: 1845-1850.
- NODA, T.; SAGARA, H. [...]; CHENG, R. N., KAWAOKA, Y. (2006): Architecture of ribonucleoprotein complexes in influenza A virus particles. *Nature* **439**: 490-492.
- NORMILE, D. (2005): Pandemic Skeptics Warn Against Crying Wolf. *Science* **310**: 1112-1113.
- (2006): Genomic Analysis Hints at H5N1 Pathogenicity. *Science* **311**: 357.
- (2006): Studies Suggest Why Few Humans Catch the H5N1 Virus. *Science* **311**: 1692.
- (2006): WHO Proposes Plan to Stop Pandemic in Its Tracks. *Science* **311**: 315-316.
- PALESE, P. Y., COMPANS, R. W. (1976): Inhibition of influenza virus replication in tissue culture by 2-deoxy-2,3-dehydro-*N*-trifluoroacetylneuraminic acid (FANA): mechanism of action. *J. Gen. Virol.* **33**: 159-163.
- PLESEHKA, S.; WOLF, T. [...]; RAPP, U. R., LUDWIG, S. (2001): Influenza virus propagation is impaired by inhibition of the Raf/MEK/ERK signalling cascade. *Nature Cell Biology.* **3**: 301-305.
- REGLERO, A. (2004): Ácidos siálicos, distribución, significado biológico y evolución. (*Discurso de incorporación como Académico Correspondiente de la Real Acad. Farm.*)
- ROSENBERG, A., SCHENGRUND, C.-L. (Eds.) (1976): Biological Roles of Sialic Acids, *Plenum Press*, New York, London.
- RUSSELL, R. J.; STEVENS, D. J. [...]; GAMBLIN, S. J., SKEHEL, J. J. (2006): Avian and human receptor binding by haemagglutinin of influenza A viruses. *Glycoconj. J.* **23**: 85-92.
- SÁNCHEZ-BERNAL, C.; MUÑOZ-BARROSO, I.; MANUGUERRA, J.-C.; HANNOUN, C., CABEZAS, J. A. (1992): Study of the *O*-acetylsterase activity of five influenza C virus strains. *Arch. Virol.* **143**: 1783.
- SCHAUER, R. (2004): Sialic Acids: Biological, pathophysiological and pharmaceutical significance. *Trabajo para su incorporación como Académico Correspondiente de la Real Acad. Nac. Farm.*
- (Ed.) (1982): Sialic Acids: Chemistry, Metabolism and Function, *Springer*, Wien, New York.
- SERKEDJIEVA, J. (2004): Antiviral activity of the red marine alga *Ceramium rubrum*. *Phytother. Res.* **18**: 480-483.

- SHINYA, K.; EBINA, M. [...]; KASAI, N., KAWAOKA, Y. (2006): Influenza virus receptors in the human airway. *Nature* **440**: 435-436.
- SOARES, C. (2005): Getting Serious about Flu. A combination of public health measures and technology raises hope for the flu sight. *Scient. Am.* Dic: 32.
- SULLENGER, B. A., GILBOA, E. (2002): Emerging clinical applications of RNA. *Nature* **418**: 252-257.
- SUZUKI, T.; TSUKIMOTO, M. [...]; KAWAOKA, Y.; WEBSTER, R. G., SUZUKI, Y. (1994): Sialoglycoproteins that bind influenza A virus and resist viral neuraminidase in different animal sera. *J. Gen. Virol.* **75**: 1769-1774.
- TOMPKINS, S. M.; LO, C. Y.; TUMPEY, T. M., EPSTEIN, S. L. (2004): Protection against lethal influenza virus challenge by RNA interference *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**: 8682-8686.
- (2004): Protection against letal influenza virus challenge by RNA interference *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**: 8682-8686.
- TRAVING, C., SCHAUER, R. (1998): Structure, function and metabolism of sialic acids. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* **54**: 1330-1349.
- TSANG, K. W.; ENG, P.; LIAN, C. K.; SHIM, V., LAM, W. K. (2005): H5N1 influenza pandemic: contingency plans. *The Lancet* **366**: 533-534.
- TUMPEY, T. M.; GARCÍA-SASTRE, A. [...]; PALESE, P., BASLER, C. F. (2002): Existing antivirals are effective against influenza viruses with genes from the 1918 pandemic virus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**: 13849-13854.
- VON ITZSTEIN, M. [...]; COLMAN, P. M.; VARGHESE, J. N. [...], PENN, CH. R. (1993): Rational design of potent sialidase-based inhibitors of influenza virus replication. *Nature* **363**: 418-423.
- WEIS, W.; BROWN, J. H. [...]; SKEHEL, J. J., WILEY, D. C. (1998): Structure of the influenza virus haemagglutinin complexed with its receptor, sialic acid. *Nature* **333**: 426-431.
- WHITE, M. R.; CROUCHY, E.; VAN EÿK, M., HASTSHORN, M. *et. al.* (2005): Cooperative anti-influenza activities of respiratory innate immune proteins and neuraminidase inhibitor. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **288**: L831-L840.
- WHO. The Writing Committee of the World Health Organization Consultation on Human Influenza A/H5. (2005): Avian Influenza A (H5N1) Infections in Humans. *N. Engl. J. Med.* **353**: 1374-1385.
- WU, J. C.; PEET, G. W. [...]; GRIFFIN, J. A., FARINA, P. R. (1995): Non-Sialate Inhibition of Influenza A/WSN/33 Neuraminidase. *Biochemistry* **34**: 7154-7160.
- YUEN, K. Y.; CHAN, P. K. S.; PEIRIS, M. [...], CHENG, A. F. (1998): Clinical features and rapid viral diagnosis of human disease associated with avian influenza A H5N1 virus. *The Lancet* **351**: 467-470.

*Nota:* Resúmenes de algunas de las publicaciones de **Cabezas, J. A.**, aquí citadas, pueden ser consultadas en la página web de esta Academia: [www.ranf.com](http://www.ranf.com)

## ADDENDUM A LA BIBLIOGRAFÍA

Con posterioridad a la terminación de redacción del presente trabajo, han aparecido artículos entre los que destacan los siguientes relacionados con las secciones del mismo que se citan a continuación:

### Secciones 2.4 y 6.1:

OLSEN, B.; MUNSTER, V. J. [...]; OSTERHAUS, A. D., FOUCHIER, R. A. (2006): Global patterns of influenza a virus in wild birds. *Science* **312**: 384-8.

### Sección 4:

VAN RIEL, D.; MUNSTER, V. J. [...]; OSTERHAUS, A. D., KUIKEN, T. (2006): H5N1 Virus Attachment to Lower Respiratory Tract. *Science* **312**: 399.

STEVENS, J. [...]; TAUBENBERGER, J. K.; PAULSON, J. C., WILSON, I. A. (2006): Structure and receptor specificity of the hemagglutinin from an H5N1 influenza virus. *Science* **312**: 404-410.

### Sección 6.4:

GERMANN, T. C.; KADAU, I. M.; LONGINI, I. M., MACKEN, C. A. (2006): Mitigation strategies for pandemic influenza in the United States. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**: 5935-40.

ENSERINK, M. (2006): Oseltamivir becomes plentiful-but still not cheap. *Science* **312**: 382-3.

REGOES, R. R., BOENHOEFFER, S. (2006): Emergence of drug-resistant influenza virus: population dynamical considerations. *Science* **312**: 389-91.

SMITH, D. J. (2006): Predictability and preparedness in influenza control. *Science* **312**: 392-4.

KUIKEN, T.; HOLMES, E. C. [...]; WILLIAMS, E. S., GRENFELL, B. T. (2006): Host species barriers to influenza virus infections. *Science* **312**: 394-7.

VILLAR, E., MUNOZ BARROSO, I. (2006): Role of sialic and containing molecules in paramyxovirus entry into the host cell: A minireview. *Glycoconj. J.* **23**: 5-17.